



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS  
AQUOSAS UTILIZANDO TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM  
PONTEIRA DESCARTÁVEL (DPX) COM BIOSSORVENTE  
BRÁCTEA**

**MELAINE MAZURKIEVICZ**

Florianópolis  
Novembro/2018

**Melaine Mazurkiewicz**

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS AQUOSAS  
UTILIZANDO TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRA  
DESCARTÁVEL (DPX) COM BISSORVENTE BRÁCTEA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)

\_\_\_\_\_  
**Prof<sup>o</sup> Dr. Eduardo Carasek da Rocha**

\_\_\_\_\_  
**Ma. Sângela Nascimento do Carmo**

Florianópolis  
Novembro/2018

Este trabalho é dedicado à minha mãe,  
Cleusa do Carmo do Valle.

## **Agradecimentos**

A minha mãe Cleusa, pai Onelio, irmã Marina, tia Nena e demais familiares, por acreditarem e apoiarem meus sonhos. Aos meus avós Ernesto, Valdomira, Zenon e Joana, vocês não estão mais neste plano, mas sei que estão muito felizes por mim, saudades eternas.

A todas as amigadas que Florianópolis me proporcionou, em especial a Fabi e a Aline, foram tantas alegrias, mas também obrigada pelo apoio nos momentos de fraqueza. Sem vocês eu não estaria aqui hoje.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório CROMAAS, pelo companheirismo e disposição ao sanar minhas dúvidas. Em especial, ao meu orientador, Professor Eduardo Carasek, e a minha mentora, Sângela, por toda ajuda, compreensão e paciência com a realização deste projeto.

A Associação Atlética Acadêmica de Química (ATQ), pelo ambiente de descontração e estudos, além de me proporcionar novos conhecimentos e tantas amigadas. A ATQ me mostrou que para ser família não é necessário laço sanguíneo. Amei participar de uma parte de sua história.

A UFSC pelo ensino público e de qualidade e a todos os professores que participaram da minha formação acadêmica.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Revisão da literatura.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Fármacos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Preparo de amostras.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Extração em ponteira descartável.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Biossorventes.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Materias e reagentes.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Instrumentação.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das ponteiras de DPX com bráctea.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Otimização do procedimento da DPX.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b>Parâmetros analíticos de mérito.....</b>	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Exatidão e precisão do método proposto.....</b>	<b>29</b>
<b>4.7</b>	<b>Teste de robustez.....</b>	<b>30</b>
<b>4.8</b>	<b>Aplicação do método proposto em amostras de efluentes hospitalares.....</b>	<b>31</b>
<b>4.9</b>	<b>Segurança no trabalho.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>Separação cromatográfica.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2</b>	<b>Otimização do método.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Otimização univariada do pH da amostra.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Otimização da massa de bráctea.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Otimização do solvente de dessorção.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Otimização do número de ciclos de solvente de dessorção.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Otimização para adição de sal, volume de amostra e ciclos de extração.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da etapa de limpeza da bráctea na DPX.....</b>	<b>40</b>
<b>5.4</b>	<b>Figuras analíticas de mérito.....</b>	<b>40</b>
<b>5.5</b>	<b>Exatidão e precisão do método.....</b>	<b>41</b>
<b>5.6</b>	<b>Teste de robustez.....</b>	<b>42</b>

<b>5.7 Aplicação em amostras de efluentes hospitalares.....</b>	<b>43</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>44</b>
<b>7 Referências.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representando a ponteira de DPX.....	16
<b>Figura 2.</b> Etapas envolvidas no processo de DPX.....	17
<b>Figura 3.</b> (A) Árvore de <i>A. angustifolia</i> (B) Pinha (C) Sementes desenvolvidas (pinhão) da <i>A. angustifolia</i> e (C) Sementes não desenvolvidas (bráctea) da <i>A. angustifolia</i> .....	20
<b>Figura 4.</b> Espectroscopia de infravermelho obtida da bráctea.....	21
<b>Figura 5.</b> Micrografia eletrônica de varredura obtidas da superfície da bráctea com Ampliação de 2000x.....	22
<b>Figura 6.</b> Cromatograma da separação dos cinco fármacos.....	33
<b>Figura 7.</b> Gráfico de barras obtido para os diferentes valores de pH estudados.....	34
<b>Figura 8.</b> Gráfico de barras obtido para avaliação da massa de bráctea adicionada na ponteira de DPX.....	35
<b>Figura 9.</b> Simplex-centroide obtido para a escolha do melhor solvente de dessorção.....	36
<b>Figura 10.</b> Superfície de resposta obtida pelos resultados do planejamento Doehlert.....	37
<b>Figura 11.</b> Superfícies de resposta obtidas após a otimização multivariada do número de ciclos de extração, volume de amostra e adição de sal.....	39
<b>Figura 12.</b> Gráfico de Lenth's.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estruturas e propriedades físico-químicas dos fármacos usados como analitos no presente estudo.....	14
<b>Tabela 2.</b> Trabalhos reportados na literatura utilizando a técnica de DPX como preparo de amostra.....	18
<b>Tabela 3.</b> Experimentos realizados para a escolha do solvente de dessorção.....	26
<b>Tabela 4.</b> Tabela de experimentos utilizados no planejamento Doehlert.....	26
<b>Tabela 5.</b> Dados estatísticos gerados pelo Statistica™.....	27
<b>Tabela 6.</b> Planejamento composto central empregado na otimização da extração de fármacos por DPX. Fonte: Autoria própria (2018).....	28
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros selecionados para realização do teste de Youden.....	30
<b>Tabela 8.</b> Combinação entre os parâmetros da condição nominal e da variação escolhida.....	31
<b>Tabela 9.</b> Tempos de retenção dos analitos no HPLC-DAD-FD.....	33
<b>Tabela 10.</b> Faixas lineares de trabalho, coeficientes de correlação e limites de detecção e quantificação obtidos.....	40
<b>Tabela 11.</b> Recuperações relativas e precisões intradia e interdia para a determinação de fármacos em amostra de efluente hospitalar.....	41
<b>Tabela 12.</b> Comparação do método proposto com estudos previamente reportados na literatura para a determinação de fármacos.....	44

## LISTAS DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BA $\mu$ E - Microextração em Barra Adsorptiva, do inglês *Bar adsorptive microextraction*.

DAD - Detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode array detector*.

DPX – extração em ponteira descartável, do inglês *Disposable pipette extraction*.

DPX-Blank – Extração em ponteira descartável branca, do inglês *Blank disposable pipette extraction*.

ETEs – Estações de Tratamento de Esgoto

EUA – Estados Unidos da América.

FLD – detector por fluorescência, do inglês *Fluorescence detector*.

FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared*.

GC – Cromatografia gasosa, do inglês *Gas chromatography*.

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High performance liquid chromatography*.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente.

MeOH – Metanol.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MS - Espectrômetria de massas, do inglês *mass spectrometry*.

LC – Cromatografia líquida, do inglês *Liquid chromatography*.

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-liquid extraction*.

LOD – Limite de detecção, do inglês *Limit of detection*.

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *Limit of quantification*.

R – Coeficiente de correlação linear.

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*.

SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid phase extraction*.

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid phase microextraction*.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

## RESUMO

Nesse estudo, foi proposto o uso de um bioissorvente, a bráctea, como fase extratora para a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) para determinação dos fármacos carbamazepina, cetoprofeno, diclofenaco, losartana e naproxeno em amostras de água de efluentes hospitalares. A determinação dos analitos foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector por arranjo de diodos e a um detector por fluorescência (HPLC-DAD/FLD). As otimizações dos parâmetros que afetam a eficiência da técnica foram avaliadas empregado planejamentos experimentais univariados e multivariados. As condições ótimas do procedimento de extração foram 800  $\mu\text{L}$  de amostra em 11 ciclos, onde cada ciclo foi de 30 segundos, pH da amostra mantido em 3, utilização de 5 mg de bráctea e adição de 25% de NaCl (m/v). Para a etapa de dessorção, as condições otimizadas foram 100  $\mu\text{L}$  de uma mistura dos solventes metanol e acetonitrila (50:50, v/v), utilizando-se 7 ciclos de 30 segundos. Parâmetros analíticos de mérito foram avaliados e o método apresentou resultados satisfatórios com limites de detecção variando entre 0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o naproxeno e 3,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o cetoprofeno e limites de quantificação variando de 0,10 de  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o naproxeno a 10,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o cetoprofeno. Os coeficientes de correlação obtidos variaram entre 0,9898 para a losartana a 0,9999 para o cetoprofeno. A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação relativa dos analitos, alcançando uma variação entre 67 a 134%. A precisão foi verificada através de desvios padrões relativos (RSD %) e ensaios interdia e intradia foram empregados. A precisão intradia (n=3) e interdia (n=9) apresentaram valores inferiores a 20%. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de efluentes hospitalares.

*Palavras-Chave: bioissorvente, bráctea, DPX, fármacos, efluentes hospitalares.*

## **1 Introdução**

O avanço nas pesquisas em busca do tratamento de doenças, trouxe um acréscimo no consumo de medicamentos pela população. No entanto, estima-se que no máximo 50% da dosagem de um medicamento seja metabolizada pelo organismo humano, o restante acaba sendo excretado em esgoto doméstico<sup>1</sup>. Além disso, existe um vasto número de fármacos disponíveis à venda sem prescrição médica, este fato em conjunto com a constante procura pelo bem-estar, faz com que parte da população mantenha um estoque de determinada medicação, a qual pode não ser utilizada antes de seu vencimento<sup>2</sup>. Apesar da maioria das farmácias e postos de saúde brasileiros possuírem coleta de fármacos vencidos, muitas vezes os mesmos são descartados de maneira não adequada e acabam contaminando os recursos naturais<sup>1,3</sup>. Recentemente, o monitoramento de fármacos no meio ambiente vem ganhando grande interesse, pois muitos desses compostos já foram detectados em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais<sup>1</sup>. O acúmulo desse tipo de substância na água, mesmo em concentrações baixas, pode causar efeitos adversos à saúde em seres humanos e em outros organismos<sup>3</sup>.

Em análises de amostras ambientais, muitas vezes, é essencial realizar uma etapa de preparo de amostra, visto que a maioria das matrizes são complexas e os analitos estão presentes em concentrações muito baixas. Diante disso, busca-se usar preparos de amostras que tenham como características a simplicidade, boa reprodutibilidade, baixo custo e geração mínima de resíduos<sup>4</sup>. Nesse sentido, a extração em ponteira descartável (DPX) se destaca, pois essa é uma técnica que utiliza uma pequena quantidade de um material extrator em uma ponteira, sendo assim uma técnica de baixo custo, além de gerar pouca quantidade de resíduos e ser de fácil manuseio. Outra vantagem associada à DPX é a possibilidade de desenvolver novas metodologias abrangendo diferentes fases extratoras, visando aumentar a eficiência e a seletividade na extração de diferentes compostos. Recentemente, grande ênfase vem sendo dada para a utilização de materiais biossorventes, tal como a bráctea, como fase extratora em técnicas de microextração.

Diante do exposto, este estudo propõe o uso de um biossorvente, a bráctea, como fase extratora para a técnica de DPX para determinação de carbamazepina, cetoprofeno, diclofenaco, losartana e naproxeno em amostras de efluentes hospitalares.

## **2 Revisão da literatura**

### **2.1 Fármacos**

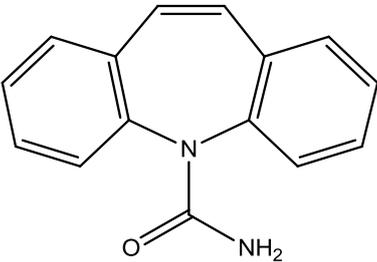
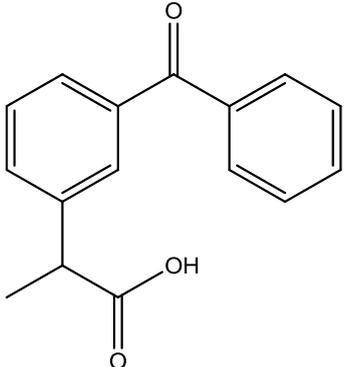
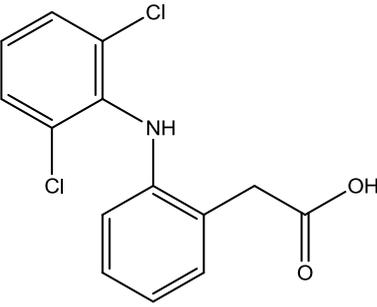
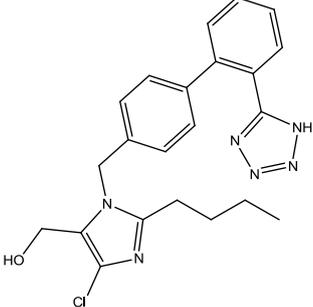
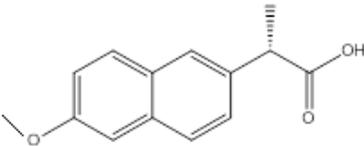
Segundo a definição da ANVISA, fármaco é o termo usado para qualquer substância que tenha propriedades farmacológicas com finalidade medicamentosa, utilizada para diagnóstico, alívio ou tratamento, empregada para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos, em benefício da pessoa na qual se administra<sup>5</sup>.

Atualmente, no Brasil existem mais de 3000 fármacos registrados e esses podem ser classificados com base na sua origem, modo de ação, estrutura química ou doença tratada<sup>6</sup>. Em relação aos fármacos analisados nesse estudo, a carbamazepina pertence à classe dos anticonvulsivantes e é principalmente utilizada no tratamento de epilepsia<sup>7</sup>. O cetoprofeno, diclofenaco e o naproxeno possuem atividade anti-inflamatória, analgésica e antitérmica e, portanto, são utilizados no tratamento de dor e inflamação<sup>8,9,10</sup>. O principal uso da losartana é no tratamento de hipertensão, mas esse medicamento também vem sendo utilizado em casos de insuficiência cardíaca<sup>11</sup>. A Tabela 1 apresenta as estruturas desses compostos, como também algumas de suas propriedades físico-químicas.

O descarte incorreto dos fármacos e a falta de um método adequado para a eliminação dos mesmos no tratamento de água residuais de origem doméstica, hospitalar e industrial, faz com que estes tipos de compostos sejam encontrados em níveis traços no meio ambiente<sup>12</sup>. Devido a diversidade de estruturas químicas e propriedades dos fármacos, o verdadeiro impacto desses tipos de compostos na saúde humana é ainda não é totalmente conhecido<sup>13</sup>. Contudo, sabe-se que a bioacumulação dos fármacos pode acarretar diversos efeitos prejudiciais à vida aquática, podendo causar danos morfológicos, metabólicos e até alterações sexuais<sup>12</sup>.

A preocupação com micropoluentes, tais como os fármacos, e a dificuldade de identificação dos mesmos no meio ambiente, fazem com que sejam desenvolvidas pesquisas e novos métodos analíticos para extração e quantificação destes compostos em matrizes ambientais complexas<sup>14</sup>.

**Tabela 1.** Estruturas e propriedades físico-químicas dos fármacos usados como analitos no presente estudo. Fonte: Adaptado de Ying<sup>15</sup>.

Analito	Estrutura	pKa	logK <sub>ow</sub>	Classificação
carbamazepina		13,9	2,45	Antiepilético
cetoprofeno		4,45	3,12	Anti-inflamatório e analgésico
diclofenaco		4,15	4,51	Anti-inflamatório e analgésico
losartana		4,07; 5,5; 14,3	4,01	Anti-hipertensivo
naproxeno		4,15	3,18	Anti-inflamatório e analgésico

## 2.2 Preparo de amostras

O preparo de amostra pode ser considerado a principal etapa de uma análise química, pois é nela que ocorrerá a extração do analito presente na matriz, deixando

assim a amostra livre de interferentes que podem interferir no resultado e/ou danificar o equipamento analítico utilizado. Além disso, durante esta etapa, muitas vezes o analito também é pré-concentrado, considerando que frequentemente esses encontram-se em níveis traços na amostra. A utilização de um preparo de amostra inadequado pode afetar a exatidão, precisão e sensibilidade do método<sup>16</sup>.

O preparo de amostra varia para cada tipo de matriz e analito, mas de forma geral, é desejado que ele seja simples, rápido, de baixo custo, aumente a seletividade e a especificidade e utilize quantidades mínimas ou nenhuma de solventes orgânicos<sup>4,17,18</sup>.

As técnicas tradicionais de preparo de amostras são a LLE (Extração Líquido-Líquido) e a SPE (Extração em Fase Sólida). Apesar de serem frequentemente utilizadas em procedimentos analíticos, essas técnicas apresentam algumas desvantagens, pois utilizam quantidades relativamente altas de solventes orgânicos, tornando-as danosas ao meio ambiente e à saúde do analista, além de serem laboriosas e propensas a perdas de analito, o que pode resultar em uma maior probabilidade de erros experimentais<sup>19</sup>.

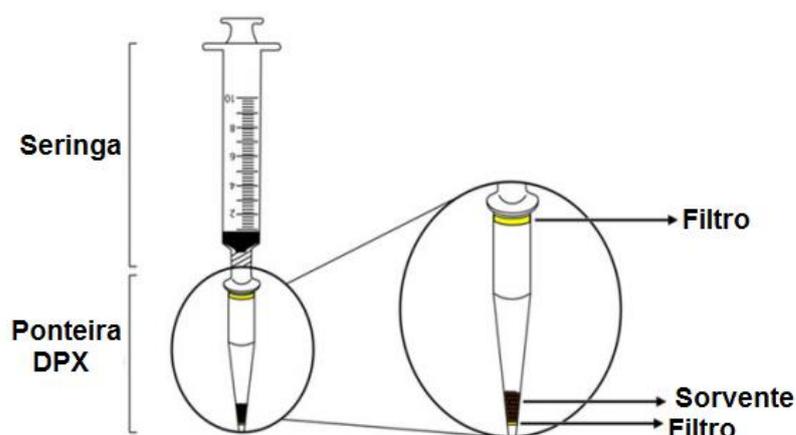
Diante dessa problemática, surgiu nos anos 90 a técnica de SPME (Microextração em Fase Sólida), e como consequência, outras técnicas de microextração foram/vêm sendo desenvolvidas e têm apresentado atualmente uma elevada importância, pois buscam a simplificação, miniaturização, automação e o emprego de técnicas livres de solventes orgânicos<sup>4,16</sup>. Exemplos dessas técnicas incluem a Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE), a Microextração em Barra Adsorviva (BA $\mu$ E) e a Extração em Ponteira Descartável (DPX). Dentre as técnicas de microextração citadas, a DPX foi selecionada para ser utilizada neste estudo como técnica de preparo de amostras.

### **2.2.1 Extração em Ponteira Descartável**

A Extração em Ponteira Descartável (DPX) foi desenvolvida em 2003, pelo americano Dr. William Brewer, e surgiu como uma nova abordagem à SPE convencional<sup>20</sup>. A técnica se fundamenta em um sorvente contido livremente no interior de uma ponteira, sendo completamente misturado à solução de amostra por meio de uma aspiração de ar. A ponteira utilizada trata-se de uma ponteira de pipeta modificada (Figura 1), onde uma pequena quantidade de sorvente fica dispersa entre

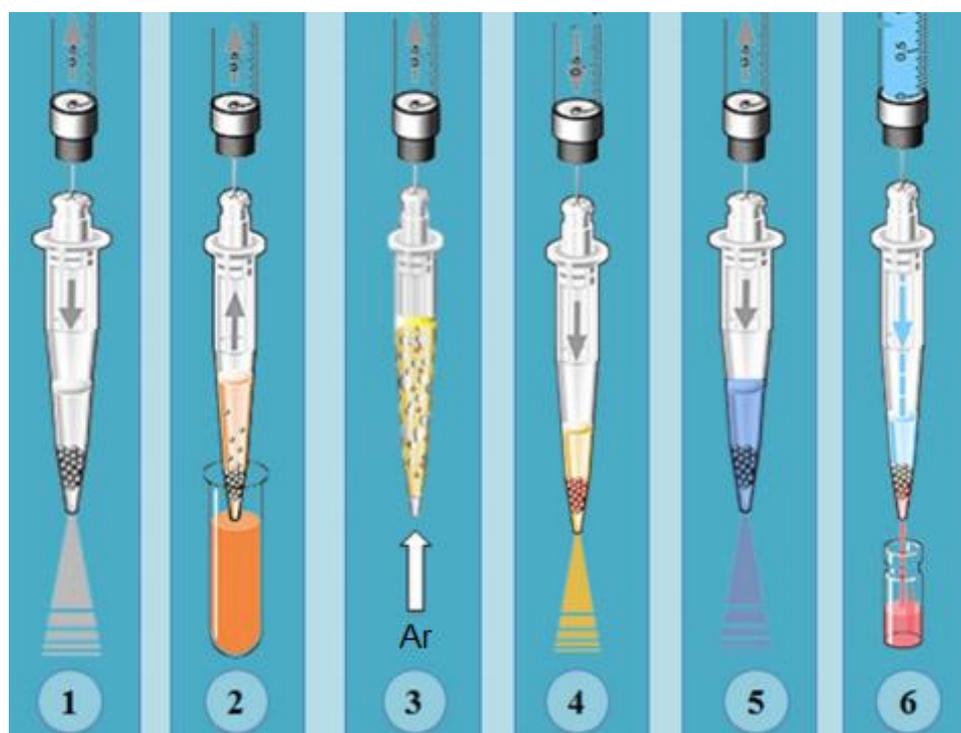
dois filtros – um localizado na parte inferior da pipeta, permitindo o fluxo bidirecional de fluídos ao mesmo tempo que retém a fase extratora, e o outro na porção superior, impedindo a contaminação da pipeta por qualquer material sólido ou fluído<sup>21</sup>. Geralmente, estes filtros são compostos por vidro sinterizado, polímero poroso ou membrana semipermeável<sup>20</sup>.

**Figura 1.** Esquema representando a ponteira de DPX. Fonte: Adaptado de Bordin<sup>21</sup>.



As etapas da DPX se baseiam na separação do analito promovida por afinidade. O método apresenta como etapas: (1) o condicionamento da fase extratora com solvente adequado; (2) aspiração da amostra líquida para o interior da ponteira; (3) aspiração de ar, resultando na mistura da amostra e fase extratora; (4) descarte da amostra; (5) lavagem com solvente e aspiração de ar para eliminação de interferentes; (6) eluição do analito utilizando o solvente mais adequado e aspiração de ar<sup>21</sup>. Após o procedimento, o extrato pode ser analisado em equipamento analítico adequado. A Figura 2 representa as etapas da DPX.

**Figura 2.** Etapas envolvidas no processo de extração por DPX. Fonte: Adaptado de Bordin<sup>21</sup>.



A extração por DPX apresenta características vantajosas, pois é um método simples e rápido, que emprega a utilização de pequenas quantidades da fase extratora e, conseqüentemente, pequenos volumes de amostra e solvente orgânico. Além disso, oferece alta recuperação e eficiência<sup>20,21</sup>. A aplicabilidade da DPX é vasta e abrange análises forenses, ambientais e alimentares. A técnica também faz uso de uma variedade de fases extratoras e matrizes, como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Trabalhos reportados na literatura utilizando a técnica de DPX como preparo de amostra.

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Material extrator</b>	<b>Referência</b>
Agrotóxicos organoclorados e organofosforados	Alimentos	GC-MS	Grupo poliamino	GUAN et al., 2009 <sup>25</sup>
Metanfetaminas e anfetamina	Sangue	GC-MS	C18	HASEGAWA et al., 2007 <sup>26</sup>
Explosivos	Água	LC-MS/MS	Estireno-divilbenzeno	GUAN et al., 2014 <sup>27</sup>
Desreguladores endócrinos fenólicos	Água	HPLC-FLD	Si3Py <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> *	CORAZZA et al., 2017 <sup>24</sup>
Conservantes	Água	HPLC-DAD	Cortiça	MORES, 2017 <sup>19</sup>

\* Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>: cloreto de 3-n-propil (3-metilpiridínio) silsesquioxano

A primeira ponteira de DPX desenvolvida possuía como fase extratora partículas de C18 embutidas em um polímero<sup>22</sup>. Posteriormente, outros materiais sorventes foram introduzidos comercialmente, baseados em diferentes modos de interação, como por exemplo a DPX com sílica monolítica<sup>20,22</sup>. No entanto, existe a chamada DPX branco que é vendida com o objetivo de desenvolver fases extratoras alternativas às comerciais disponíveis. Na literatura, é possível encontrar trabalhos que utilizaram como fase extratora a modificação das partículas de C18 com albumina, um material híbrido inorgânico (Si3Py<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>), como também a utilização do biossorvente cortiça<sup>19,23,24</sup>.

### 2.3 Biossorventes

Atualmente, existem diversos sorventes comerciais disponíveis para as mais variadas técnicas de extração/microextração, porém, o uso de materiais naturais como alternativa para serem utilizados como fases extratoras têm se destacado, pois possuem fácil disponibilidade e pequeno custo. Quando o material é de origem natural e possui propriedades adsorptivas, denomina-se biossorvente<sup>29</sup>. Em química analítica, os biossorventes se destacam em processos de extração/microextração, pois

possuem boa estabilidade química e física, são ambientalmente amigáveis, além de possuírem fácil obtenção e baixo custo<sup>19</sup>. Na literatura, vêm sendo empregados principalmente na recuperação de metais<sup>30,31</sup> e em análises de contaminantes emergentes<sup>19,32</sup>.

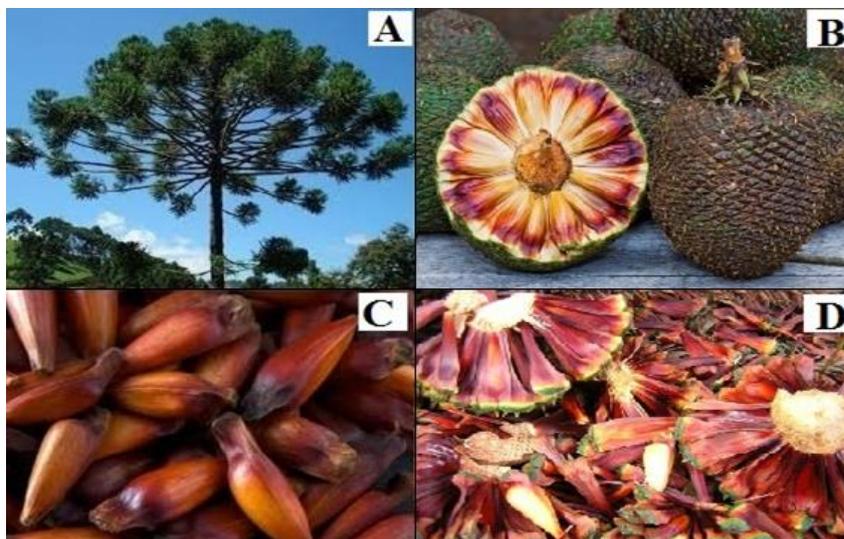
Há uma variedade de categorias para os biossorventes, incluindo fungos, algas, resíduos industriais e resíduos da agricultura. Neste último, se destaca os materiais lignocelulósicos, formados principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, macromoléculas que conseguem interagir com uma variedade de compostos devido suas características estruturais<sup>29</sup>.

Este trabalho propõe o uso de um material lignocelulósico, a bráctea, para ser utilizado como fase extratora para a técnica de DPX.

### 2.3.1 Bráctea

A bráctea é um material natural lignocelulósico, proveniente da *Araucária angustifolia*, uma conífera conhecida popularmente como pinheiro, encontrada principalmente na região sul do Brasil<sup>33</sup>. A *A. angustifolia* produz a pinha – um cacho de sementes formado a partir da floração da espécie. A pinha é composta por espécimes masculinos e femininos, os quais possuem seus próprios estróbilos distintos. É no estróbilo feminino que se encontra as sementes (pinhões) e as brácteas, que são sementes não desenvolvidas<sup>34</sup>. A Figura 3 apresenta algumas partes constituintes da *A. angustifolia*.

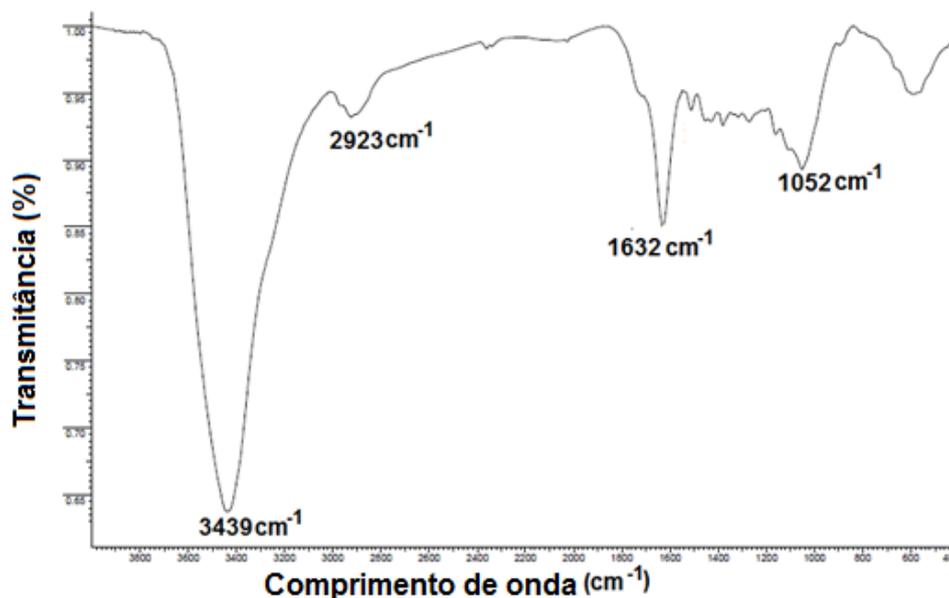
**Figura 3.** (A) Árvore de *A. angustifolia* (B) Pinha (C) Sementes desenvolvidas (pinhão) da *A. angustifolia* e (D) Sementes não desenvolvidas (bráctea) da *A. angustifolia*.



O pinhão tem certa importância econômica e ambiental, pois além de estar presente na culinária brasileira, é também muito importante para a alimentação da fauna local. Estima-se que 15 a 20% da pinha seja composta por pinhões, sendo o restante constituído por brácteas, que normalmente são descartadas no meio ambiente<sup>33</sup>. Dessa forma, uma aplicação para a bráctea seria a utilização da mesma como bioabsorvente para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas no emprego do preparo de amostras, considerando que esse material consiste de 45% de lignina e 46% de holocelulose (celulose e hemicelulose), biopolímeros com vários grupos químicos polares e apolares que podem participar de diversas interações com os analitos, incluindo sorção, complexação e troca iônica<sup>33</sup>.

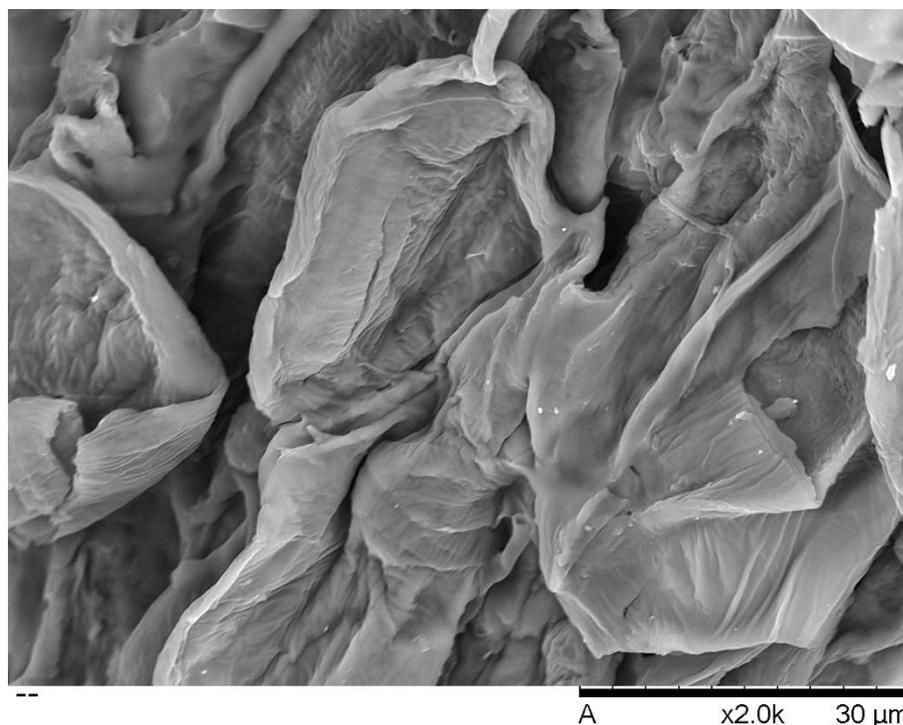
Para identificar grupos funcionais presentes na bráctea, em um estudo anterior, foi obtido um espectro de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) (Figura 4) e para verificar a morfologia da superfície do material foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) com ampliação de 2000 vezes (Figura 5)<sup>30</sup>.

Figura 4. Espectroscopia de infravermelho obtida da bráctea. Fonte: CARMO<sup>30</sup>.



A Figura 4 mostra o espectro de FTIR obtido a partir da bráctea (200 mesh) que foi usada para preparar as ponteiras de DPX. A banda observada em  $2923\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento de C-H e em  $1052\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao estiramento da ligação C-O-C atribuída aos polissacarídeos e à lignina. A banda larga em  $3439\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento O-H. Este grupo funcional aparece na celulose e nas hemiceluloses presentes na bráctea. O pico observado em  $1632\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao estiramento C=C dos anéis aromáticos que estão presentes na lignina. Esses resultados mostram uma composição química heterogênea deste material, oferecendo inúmeras possibilidades de interação para uma ampla gama de compostos.

**Figura 5.** Micrografia eletrônica de varredura obtidas da superfície da bráctea com Ampliação de 2000x. Fonte: CARMO<sup>30</sup>.



Além disso, observando a Figura 4, nota-se que a morfologia deste material mostra uma superfície relativamente porosa, o que pode facilitar o processo de adsorção física dos analitos.

Na literatura, encontram-se estudos com bons resultados que utilizaram a bráctea como bioissorvente para SPME para determinação de pesticidas organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos<sup>35</sup>.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral desse estudo é desenvolver e aplicar uma metodologia analítica que utilize a bráctea como fase extratora para a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) para determinação de carbamazepina, cetoprofeno, diclofenaco, losartana e naproxeno em efluente hospitalar por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detectores por arranjo de diodos e fluorescência (HPLC-DAD/FLD).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Otimizar a separação dos analitos utilizando o HPLC-DAD/FLD;
- Otimizar os parâmetros da técnica de DPX, dividindo-se em:
  - tipo de solvente, ciclo e volume de solvente para a etapa de dessorção;
  - pH da amostra, ciclo, adição de NaCl e massa de bráctea para a etapa de extração;
- Otimizar a etapa de limpeza entre cada experimento;
- Determinar os principais parâmetros de mérito, incluindo limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de correlação (R) e faixa linear de trabalho;
- Determinar a exatidão do método através das recuperações relativas dos analitos;
- Verificar a precisão do método através de desvio padrão relativo (RSD%) utilizando ensaios de precisão intradia e interdia;
- Avaliar a robustez do método através do teste de Youden;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de efluente hospitalares.

## **4 Materiais e métodos**

### **4.1 Materiais e reagentes**

Neste estudo, os padrões analíticos de diclofenaco, carbamazepina, cetoprofeno, losartana e naproxeno foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Uma solução de trabalho foi preparada com uma mistura de cada analito em concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> em metanol obtido da J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). Os solventes acetonitrila e metanol, ambos grau HPLC, foram obtidos da J.T. Baker (Mallinckrodt, NJ, EUA). O ácido fórmico adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e a água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação de água (Mega Pureza, Billerica, EUA). A adição de sal na amostra foi avaliada utilizando de cloreto de sódio obtido da Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil). A extração foi realizada em uma ponteira DPX-Blank descartável de 1 mL (DPX Labs, Columbia, SC, EUA) e a dessorção foi realizada em frascos de 1 mL. Uma microsseringa Hamilton (Reno, Nevada, EUA) de 100 µL foi utilizada para injeção manual no cromatógrafo e um micropipetador manual de 100-1000 µL da Kasvi (China) e frascos de 10 mL foram utilizados para a realização da técnica de DPX

### **4.2 Instrumentação**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido, modelo LC 20 AT da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um detector de arranjo de diodos e um detector de fluorescência, modelo SPD-M20A, com loop de 20 µL e injetor manual Rheodyne 7725i (Rohnert Park, CA, EUA). Uma coluna C18 (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 5 µm) da Thermo (EUA) foi usada para separação cromatográfica. O fluxo de fase móvel foi de 1 mL min<sup>-1</sup> empregado no modo gradiente usando acetonitrila (A) e água ultrapura (B), ambas acidificadas com ácido fórmico, nas seguintes condições: 40% (v/v) da fase móvel A de 0 a 16 minutos; de 16 a 23 minutos a fase móvel A foi aumentada para 75% (v/v); de 23 a 25 minutos a condição inicial foi retomada. Os analitos cetoprofeno e carbamazepina foram analisados por detector por arranjo de diodos e os comprimentos de onda usados para as detecções foram ajustados em 255 nm para

cetoprofeno e 280 nm para carbamazepina. Os analitos diclofenaco, losartana e naproxeno foram analisados por detector de fluorescência. Para losartana utilizou-se os comprimentos de onda de excitação 259 nm e emissão 352 nm, com diclofenaco e naproxeno os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram 284 e 352 nm, respectivamente. O software do LC solution (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado para avaliar os dados obtidos.

### **4.3 Preparo das ponteiras de DPX com bráctea**

As brácteas utilizadas para preparar as ponteiras de DPX foram obtidas de árvores cultivadas na cidade de Curitiba (Santa Catarina, Brasil). Essas brácteas foram trituradas em um moinho de facas e peneiradas em uma peneira com granulometria de 200 mesh, obtendo-se um pó de bráctea. Esse pó foi adicionado em uma certa quantidade na ponteira de DPX e selado com um filtro, então a ponteira foi condicionada utilizando 2 ciclos com 1000 µL de metanol e posteriormente 1000 µL de água ultrapura.

### **4.4 Otimização do procedimento da DPX**

Os procedimentos de otimização do método foram realizados com uma solução contendo 300 µg L<sup>-1</sup> dos analitos em água ultrapura em uma ponteira de DPX de 1 mL. Os ensaios foram realizados usando a mesma alíquota para cada experimento. Inicialmente, para a etapa de extração, o volume de amostra foi mantido em 700 µL com 5 ciclos de 30 segundos de extração e alguns parâmetros foram selecionados para o estudo. Primeiramente, foi avaliado o pH da amostra variando-se entre 3,0; 5,0 e 7,0. Em seguida, para a avaliação da massa de bráctea foram testados 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg. Ambos estudos foram realizados de forma univariada. Posteriormente, a escolha do solvente ou mistura de solventes de dessorção (metanol, acetonitrila e água ultrapura) foi realizada através do planejamento simplex-centroide, sendo as proporções e os experimentos apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Experimentos realizados para a escolha do solvente de dessorção.

Fonte: Autoria própria.

<b>Experimento</b>	<b>MeOH (v/v)%</b>	<b>ACN (v/v)%</b>	<b>H<sub>2</sub>O U.P. (v/v)%</b>
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	66,6	16,7	16,7
8	16,7	66,6	16,7
9	16,7	16,7	66,6
10	33,3	33,3	33,3
11	33,3	33,3	33,3
12	33,3	33,3	33,3

A escolha do número de ciclos e do volume de solvente de dessorção foi realizada de forma multivariada pelo planejamento Doehlert, sendo apresentadas na Tabela 4 as faixas trabalhadas para as variáveis.

**Tabela 4.** Tabela de experimentos utilizados no planejamento Doehlert. Fonte: Autoria própria.

<b>Experimento</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Volume solvente (µL)</b>
1	1	200
2	3	100
3	3	300
4	7	100
5	7	300
6	10	200
7	5	200
8	5	200
9	5	200

A avaliação da adição de sal, número de ciclos e volume de amostra foi realizada através de um planejamento multivariado composto central, sendo apresentadas na Tabela 5 os dados estatísticos gerados a partir da Equação 1.

**Equação 1.** Equação para obter o número de experimentos para análise simultânea dos parâmetros que influenciam a extração.

$$n = 2^k + 2k + C_p$$

No qual n representa o número de experimentos, k o número de variáveis e  $C_p$  o número de replicatas no ponto central.

**Tabela 5.** Dados estatísticos gerados pelo Statistica™. Fonte: Autoria própria.

Experimento	Ciclos	Volume de amostra (µL)	Sal (% m/v)
1	-1	-1	-1
2	-1	1	1
3	1	-1	1
4	1	1	-1
5 (C)	0	0	0
6	-1	-1	1
7	-1	1	-1
8	1	-1	-1
9	1	1	1
10 (C)	0	0	0
11	-1,67332	0	0
12	1,67332	0	0
13	0	-1,67332	0
14	0	1,67332	0
15	0	0	-1,67332
16	0	0	1,67332
17 (C)	0	0	0

Utilizando os valores representados na Tabela 5 e a Equação 2, foi possível gerar os experimentos apresentados na Tabela 6.

**Equação 2.** Equação para obter o número de experimentos para análise simultânea dos parâmetros que influenciam a extração.

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}}$$

No qual  $x_i$  representa o valor codificado do planejamento dado pelo programa (Tabela),  $z_i$  é o valor experimental do nível (incógnita),  $\bar{z}$  o valor médio entre os níveis máximo e mínimo do parâmetro e  $\Delta z$  é a diferença entre o valor máximo e mínimo.

**Tabela 6.** Planejamento composto central empregado na otimização da extração de fármacos por DPX. Fonte: Autoria própria.

Experimento	Ciclos	Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	Sal (% m/v)
1	3	300	6
2	3	700	24
3	9	300	24
4	9	700	6
5 (C)	6	500	15
6	3	300	24
7	3	700	6
8	9	300	6
9	9	700	24
10 (C)	6	500	15
11	1	500	15
12	11	500	15
13	6	164	15
14	6	836	15
15	6	500	0
16	6	500	30
17 (C)	6	500	15

Foi empregada uma etapa de limpeza com 6 ciclos de 1000  $\mu\text{L}$  de ACN/MeOH 50:50 (v/v), ao final de cada experimento realizado nas otimizações. Após otimizados todos os parâmetros de extração e dessorção, um estudo de forma univariada foi realizado para avaliar o número ideal de limpezas.

Tanto os modelos multivariados como os univariados, empregados nas otimizações e as análises dos dados, foram realizadas no software Statsoft Statistica 8.0 (Statsoft, EUA) e Microsoft Excel 2016 (EUA).

#### **4.5 Parâmetros analíticos de mérito**

Os parâmetros analíticos de mérito foram obtidos através de curvas de calibração realizadas diretamente em água de efluentes hospitalares em 8 níveis de concentração para cada analito, com cada nível realizado em triplicata. Os parâmetros determinados foram limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), faixa linear de trabalho e coeficiente de correlação linear (R). O LOQ foi definido como o primeiro ponto da curva analítica e o LOD como três vezes menor do que o LOQ.

#### **4.6 Exatidão e precisão do método proposto**

A exatidão e precisão da metodologia desenvolvida foram avaliadas através de extrações em amostra de água de efluente hospitalar fortificada em três diferentes concentrações para cada analito (0,1, 100,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o naproxeno; 10,0, 100,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o cetoprofeno, 5,0, 100,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a carbamazepina e o diclofenaco e 1,0, 100,0 e 400,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a losartana). A exatidão do método foi verificada por meio de testes de recuperação relativa dos analitos, considerando valores aceitáveis aqueles entre 40 e 120%<sup>36</sup>. A precisão foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD), considerando valores aceitáveis aqueles inferiores a 45%, conforme recomenda a literatura<sup>36</sup>. A precisão intradia foi avaliada utilizando três determinações para cada nível fortificado no mesmo dia e a precisão interdia foi determinada através de três determinações em três dias diferentes.

#### 4.7 Teste de robustez

Um teste de robustez foi realizado utilizando-se o método de Youden<sup>37</sup>. Foram selecionadas 7 variáveis otimizadas no método, sendo essas a porcentagem de NaCl, pH da amostra, volume de amostra e de solvente de dessorção, massa de bráctea e ciclos de extração e dessorção, com pequena variação dos valores, onde a alteração aplicada a cada variável está apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros selecionados para realização do teste de Youden. Fonte: Autoria própria.

Efeito	Condição Nominal		Variação	
Ciclo de extração	11	A	10	a
Ciclo de dessorção	6	B	7	b
Volume de dessorção	100 µL	C	110 µL	c
Volume de extração	800 µL	D	790 µL	d
pH	3,0	E	2,5	e
Sal	25%	F	24%	f
Massa de bráctea	5 mg	G	5,5 mg	g

Através dos parâmetros escolhidos e da variação determinada, foi possível gerar uma combinação, entre a condição nominal e a variação, apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8.** Combinação entre os parâmetros da condição nominal e da variação escolhida. Fonte: Autoria própria.

Efeito	Combinação de Parâmetros							
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	C	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	D	d	d	d	D	D
E/e	E	E	E	e	e	E	e	E
F/f	F	F	F	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g

Os resultados do teste foram apresentados através do gráfico de Lenth's. A partir desse gráfico, foi possível avaliar se a variação dos parâmetros afetaria significativamente os resultados. Para a realização de todo o procedimento, utilizou-se Microsoft Excel 2016 e o Action Stat 3.

#### **4.8 Aplicação do método proposto em amostras de efluentes hospitalares**

O método desenvolvido foi aplicado em quatro amostras de efluentes hospitalares. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de uma empresa localizada na cidade de Florianópolis-SC. Por questão de sigilo, o nome da empresa e o local de coleta das amostras não podem ser divulgados.

#### **4.9 Segurança no trabalho**

Para prevenir acidentes que podem afetar a saúde e integridade física, todas as atividades foram realizadas sob o uso de equipamentos de proteção individual, como, por exemplo, jaleco e luvas de nitrilo. Além disso, o laboratório possui equipamentos de proteção coletiva, como capela de exaustão de gases, que foi utilizada para o manuseio e preparo de soluções.

Todos os resíduos gerados neste projeto foram armazenados em frascos apropriados e encaminhados para serem tratados de acordo com a gestão de resíduos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o código 160506, segundo a Instrução Normativa nº 13/2012 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). Os resíduos foram coletados pela empresa Proactiva Meio Ambiente Brasil LTDA e então encaminhados à empresa Momento Engenharia Ambiental S.A., onde foram tratados adequadamente.

## 5 Resultados e discussão

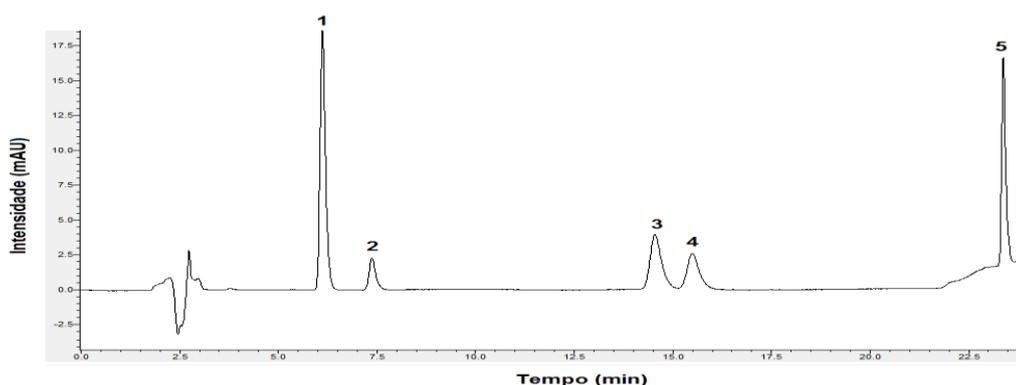
### 5.1 Separação cromatográfica

Inicialmente, foi otimizada a separação cromatográfica dos cinco analitos utilizando uma solução trabalho de 5 mg L<sup>-1</sup> preparada em metanol. Foi empregado um gradiente de solvente entre acetonitrila e água ultrapura, ambos acidificados com ácido fórmico, conforme descrito na seção 4.2, totalizando 25 minutos de corrida cromatográfica. A identificação dos analitos foi confirmada com a injeção dos padrões analíticos individuais. Os tempos de retenção obtidos e o detector utilizado para cada analito estão representados na Tabela 9 e um cromatograma mostrando a separação cromatográfica obtida está apresentado na Figura 6.

**Tabela 9.** Tempos de retenção dos analitos no HPLC-DAD-FLD. Fonte: Autoria própria.

Analito	Detector utilizado	Tempo de retenção (min)
carbamazepina	DAD	6,10
losartana	FLD	7,34
cetoprofeno	DAD	14,70
naproxeno	FLD	15,62
diclofenaco	FLD	22,7

**Figura 6.** Cromatograma da separação dos cinco fármacos. Ordem de eluição: 1- carbamazepina; 2- losartana; 3- cetoprofeno; 4- naproxeno e 5- diclofenaco. Fonte: Autoria própria.



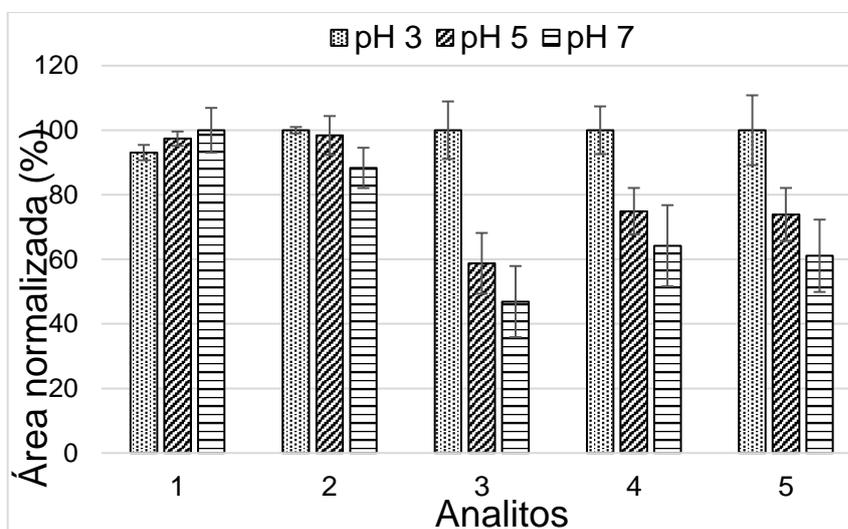
Observando a Figura 6, pode-se concluir que houve uma boa separação cromatográfica dos compostos em estudo. A separação se deve ao fato dos analitos possuírem uma variação entre seus valores de  $\log K_{ow}$ , (Tabela 1), resultando em diferentes graus de interação com a coluna cromatográfica utilizada. Sendo assim, prosseguiu-se com as otimizações do método.

## 5.2 Otimização do método

### 5.2.1 Otimização univariada do pH da amostra

Nesta etapa, uma otimização univariada foi empregada para determinar em qual pH da amostra a extração dos analitos seria mais eficiente utilizando a bráctea como fase extratora. É desejável que os analitos estejam presentes na amostra em sua forma neutra, por isso, baseado nos seus valores de  $pK_a$  (Tabela 1), foram estudados 3 valores de pH, sendo eles 3,0; 5,0 e 7,0. No gráfico de barras apresentado na Figura 7, os resultados desse estudo estão representados utilizando a média normalizada das áreas dos picos cromatográficos para cada analito.

**Figura 7.** Gráfico de barras obtido para os diferentes valores de pH estudados. Analitos: (1) carbamazepina, (2) losartana, (3) cetoporfeno, (4) naproxeno e (5) diclofenaco. (\*Condições utilizadas: fortificação de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, sem adição de sal, 5 ciclos de extração de 30 s, 10 mg de bráctea, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 1 ciclo de dessorção de 30 s, 100  $\mu\text{L}$  de solvente MeOH). Fonte: Autoria própria.

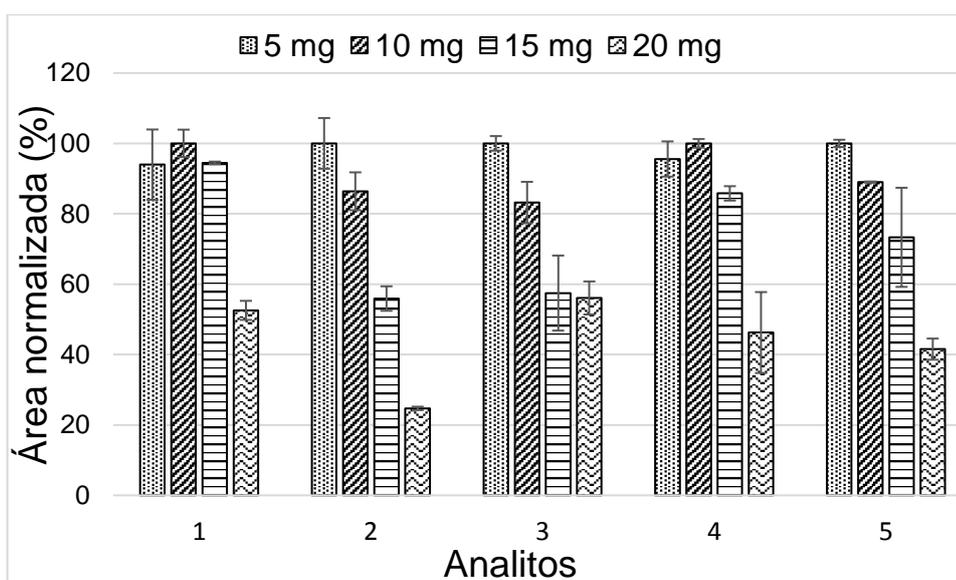


Observando os resultados apresentados na Figura 7, é possível verificar que o pH 3,0 proporcionou melhores respostas que os demais valores de pH para todos os analitos. Neste caso, a eficiência de extração é melhorada ao diminuir o pH para compostos ácidos, como é o caso dos fármacos determinados nesse estudo, pois assim as formas neutras desses compostos predominam, o que aumenta a interação dos analitos com a fase extratora. Portanto, fixou-se o pH em 3,0 como condição otimizada.

### 5.2.2 Otimização massa da bráctea

A quantidade de sorvente presente na ponteira de DPX deve permitir uma mistura dinâmica entre a fase extratora e a amostra. Diante disso, massas entre 5 e 20 mg de bráctea foram avaliadas, de maneira univariada. As respostas obtidas estão apresentadas no gráfico de barras, representado na Figura 8.

**Figura 8.** Gráfico de barras obtido para avaliação da massa de bráctea adicionada à ponteira de DPX. Analitos: (1) carbamazepina, (2) losartana, (3) cetoporfeno, (4) naproxeno, (5) diclofenaco. (\*Condições: fortificação de 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, pH mantido em 3,0, sem adição de sal, 5 ciclos de extração de 30 s, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 1 ciclo de dessorção de 30 s, 100  $\mu\text{L}$  de solvente MeOH). Fonte: Autoria própria.

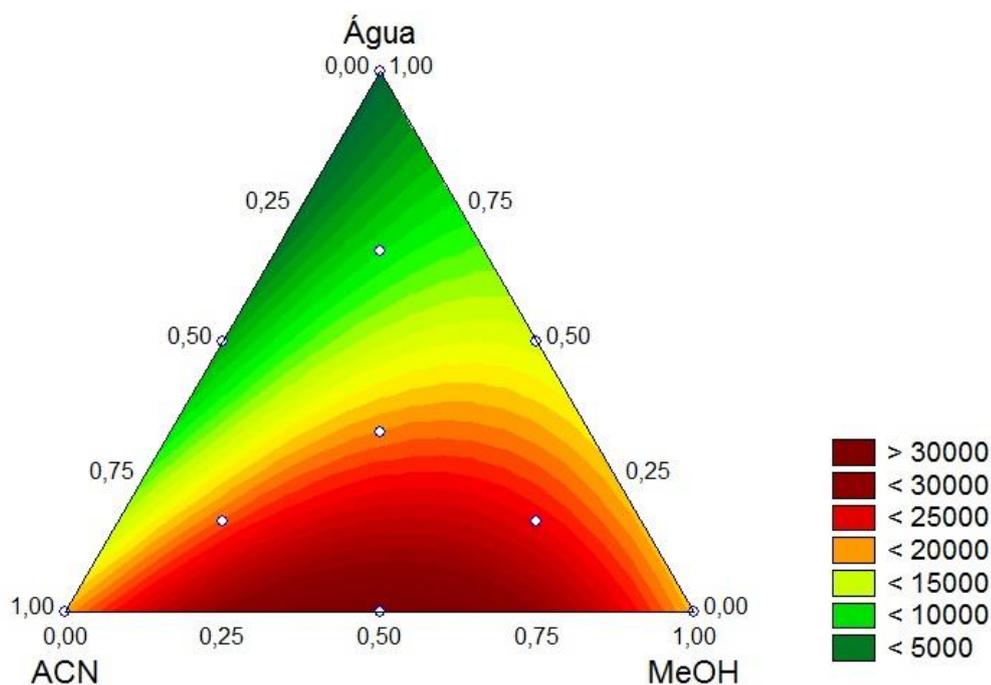


Conforme apresentado na Figura 8, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 5,0 mg de bráctea para a losartana, cetoprofeno e diclofenaco e 10 mg para a carbamazepina e o naproxeno. No entanto, visto que quantidades maiores de sorvente podem dificultar uma mistura dinâmica com a amostra aquosa, possivelmente devido a formação de pequenos aglomerados, uma massa de 5,0 mg de fase extratora foi escolhida como condição otimizada.

### 5.2.3 Otimização do solvente de dessorção

Para realizar a escolha do melhor solvente de dessorção líquida, foi empregado um planejamento multivariado simplex-centroide. Para isso, foram testados acetonitrila, metanol, água ultrapura e misturas desses solventes. No total, 12 experimentos foram realizados e utilizando a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos, gerou-se a superfície representada na Figura 9, na qual apresentou uma função quadrática com coeficiente de determinação igual a  $R^2 = 0,9544$ .

**Figura 9.** Simplex-centroide obtido para a escolha do melhor solvente de dessorção (\*Condições: fortificação de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, pH mantido em 3,0, sem adição de sal, 5 ciclos de extração de 30 s, 5 mg de bráctea, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 1 ciclo de dessorção de 30 s, 200  $\mu\text{L}$  de solvente). Fonte: Autoria própria.

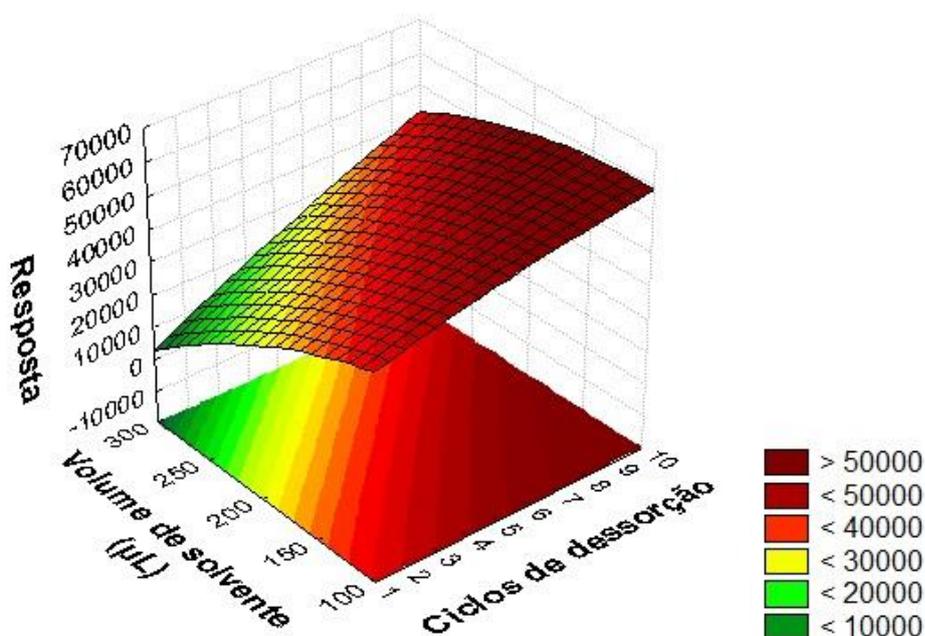


Através dos resultados apresentados na Figura 9, percebe-se que a região próxima a água ultrapura apresenta respostas muito baixas. Entretanto, a região entre acetonitrila e metanol apresentou os melhores resultados, devido aos analitos apresentarem características menos polares. Utilizando ACN/MeOH 50:50 (v/v) foi obtida uma maior quantidade de analito dessorvido da fase extratora, sendo então essa mistura de solventes escolhida como condição otimizada.

#### 5.2.4 Otimização do número de ciclos e volume de dessorção

Realizou-se um planejamento multivariado Doehlert para avaliar a influência entre o número de ciclos de extração e o volume do solvente de extração. Nesse estudo foram realizados 9 experimentos onde variou-se o número de ciclos entre 1 a 10 e quantidade de volume utilizado de 100 a 300  $\mu\text{L}$ . A partir dos experimentos realizados, foram adotadas as médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos para obter a superfície de resposta apresentada na Figura 10.

**Figura 10.** Superfície de resposta obtida pelos resultados do planejamento Doehlert. (\*Condições: fortificação de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, pH mantido em 3,0, sem adição de sal, 5 ciclos de extração de 30 s, 5 mg de bráctea, 700  $\mu\text{L}$  de amostra, 1 ciclo de dessorção de 30 s, 100  $\mu\text{L}$  de ACN/MeOH 50:50 (v/v)). Fonte: Autoria própria.

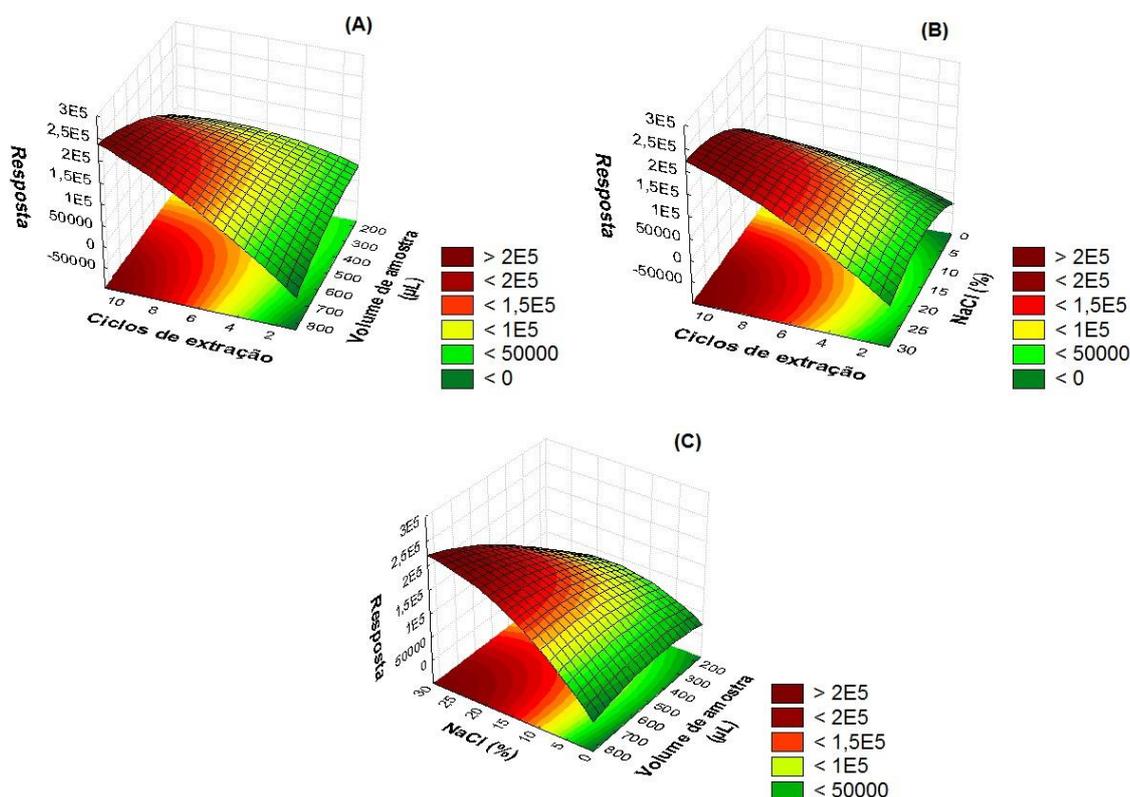


Nota-se através da Figura 10, que os melhores resultados são obtidos quando se utiliza menores volumes de solvente e aumenta-se o número de ciclos de dessorção. A utilização de um volume menor, indica uma maior pré-concentração dos analitos. Já o aumento do número de ciclos está relacionado com o equilíbrio entre a dessorção do analito da fase extratora para o solvente de dessorção. No entanto, a partir de 7 ciclos os resultados obtidos foram muito próximos. Sendo assim, escolheu-se como condições otimizadas um volume de 100 µL de solvente e 7 ciclos de dessorção.

#### **5.2.5 Otimização para adição de sal, volume de amostra e ciclos de extração**

A otimização da adição de sal, volume de amostra e ciclos de extração foi realizada através de um planejamento composto central, para tanto, variou-se o número de ciclos entre 1 a 11, o volume da amostra de 164 a 836 µL e adição de NaCl entre 0 e 30%. A superfície resposta apresentada na Figura 11 foi obtida através das médias geométricas das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos analitos, na qual apresentou coeficiente de determinação igual a  $R^2 = 0,8807$ .

**Figura 11.** Superfícies de resposta obtidas após a otimização multivariada do número de ciclos de extração, volume de amostra e adição de sal. (A) Ciclos de extração versus volume de amostra; (B) Ciclos de extração versus % de NaCl e (C) % de NaCl versus volume de amostra. (\*Condições: fortificação de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos, pH mantido em 3,0, 5 mg de bráctea, 7 ciclos de dessorção de 30 s, 100  $\mu\text{L}$  de ACN/MeOH 50:50 (v/v)). Fonte: Autoria própria.



Analisando as superfícies de resposta apresentadas na Figura 11, observa-se que quanto maior o número de ciclos de extração, volume da amostra e porcentagem de sal, também é maior a eficiência de extração. A maior eficiência de extração utilizando uma maior quantidade de NaCl pode ser explicada pelo efeito *salting out*, ou seja, ao aumentar a força iônica de uma amostra aquosa, a solubilidade de compostos orgânicos pode diminuir, facilitando sua migração para a fase sorvente. Sendo assim, as condições otimizadas escolhidas foram 11 ciclos de extração com volume de 800  $\mu\text{L}$  e concentração de sal 25% (m/v).

### 5.3 Avaliação da etapa de limpeza da bráctea na DPX

É necessário efetuar uma etapa de limpeza entre cada novo experimento para eliminar qualquer resquício que possa interferir nos resultados das próximas extrações. Para saber o número adequado de ciclos para uma limpeza completa, fez-se uma extração com todas as condições otimizadas e posteriormente foi realizado limpezas utilizando 100  $\mu\text{L}$  de ACN e MeOH 50:50 (v/v). Segundo os resultados obtidos, 1 ciclo de limpeza com a mistura de solventes mostrou-se eficaz para a retirada total dos analitos da fase extratora, entretanto optou-se pela realização de 2 ciclos de limpeza como condição otimizada.

### 5.4 Figuras analíticas de mérito

Após a otimização do método, figuras analíticas de mérito foram empregadas para avaliar o método proposto e estão apresentadas na Tabela 10. Os coeficientes de correlação (R) das curvas analíticas variaram de 0,9898 para a losartana a 0,9999 para o cetoprofeno, indicando boas correlações lineares. Os limites de detecção apresentaram valores entre 0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o naproxeno a 3,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cetoprofeno e os limites de quantificação variaram entre 0,10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o naproxeno a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o cetoprofeno.

**Tabela 10.** Faixas lineares de trabalho, coeficientes de correlação e limites de detecção e quantificação obtidos.

Analitos	Faixa linear de			
	trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
Carbamazepina	5,00 – 400,00	0,9961	1,51	5,00
Cetoprofeno	10,00 – 400,00	0,9999	3,03	10,00
Losartana	1,00 – 400,00	0,9898	0,30	1,00
Naproxeno	0,10 – 400,00	0,9963	0,03	0,10
Diclofenaco	5,00 – 400,00	0,9995	3,03	5,00

<sup>a</sup>LOD: LOQ/3,3

<sup>b</sup>LOQ: Primeiro ponto da curva de calibração

### 5.5 Exatidão e precisão do método

A avaliação da exatidão e precisão do método proposto foi realizada utilizando amostra de efluente hospitalar fortificada com 3 níveis de concentração para cada analito, sendo o primeiro igual ao LOQ, um nível intermediário e terceiro sendo a maior concentração da faixa linear de trabalho. Para a determinação da exatidão, realizou-se em triplicata ensaios de recuperação relativa dos analitos. Já a precisão do método foi calculada pelo desvio padrão relativo (RSD), sendo os ensaios da precisão intradia realizados no mesmo dia e a precisão interdia com ensaios realizados em 3 dias diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Recuperações relativas e precisões intradia e interdia para a determinação de fármacos em amostra de efluente hospitalar. Fonte: Autoria própria.

<b>Analito</b>	<b>Nível de fortificação (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação relativa (%) (n = 3)</b>	<b>Precisão intradia (RSD) (%) (n = 3)</b>	<b>Precisão interdia (RSD) (%) (n = 9)</b>
Carbamazepina	5,00	100	16	20
	100,00	116	9	12
	400,00	86	3	6
Cetoprofeno	10,00	108	7	6
	100,00	117	7	14
	400,00	86	4	8
Losartana	1,00	134	20	11
	100,00	113	12	16
	400,00	80	13	15
Naproxeno	0,10	67	14	14
	100,00	108	9	9
	400,00	95	5	3
Diclofenaco	5,00	110	10	3
	100,00	102	10	14
	400,00	89	2	17

Segundo a AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês Association of Official Analytical Chemists )<sup>38</sup>, os valores aceitáveis para precisão e recuperação dos analitos, com faixas trabalhadas em parte por bilhão, estão entre 40 a 120%<sup>35</sup>. Os resultados mostram que a recuperação relativa variou de 67% a 134%, sendo este último referente a losartana na concentração de 1 µg L<sup>-1</sup>. O valor elevado de recuperação relativa nesse caso pode estar relacionado com a baixa concentração do analito. Os ensaios de precisão intradia apresentaram valores na faixa de 2 a 20%, já os ensaios de precisão interdia variaram de 3 a 20%. Todos os resultados obtidos de precisões intradia e interdia apresentam valores menores que 45%, portanto, todos estão de acordo com os parâmetros estabelecidos pela AOAC<sup>38</sup>.

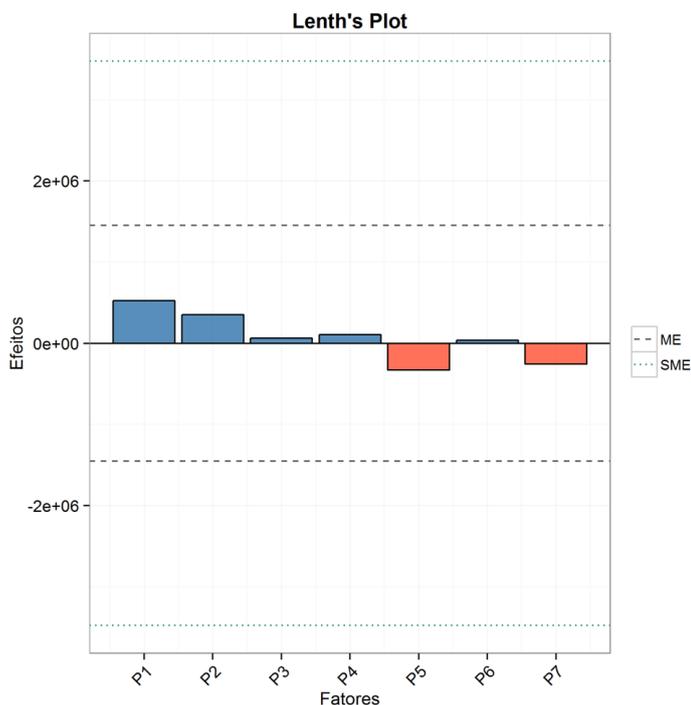
### 5.6 Teste de Robustez

O teste de Robustez de Youden foi aplicado para avaliar a robustez do método proposto. Foram selecionados 7 parâmetros otimizados no método, nos quais foram número de ciclos de extração e dessorção, volumes de extração e dessorção, pH da amostra, porcentagem de sal e massa da bráctea utilizada na ponteira de DPX. A partir dos dados gerados nos experimentos realizados de acordo com as Tabelas 7 e 8, foi possível construir o gráfico de Lenth's, apresentado na Figura 12.

O gráfico de Lenth's representa os 7 fatores delimitados entre duas linhas tracejadas – a margem de erro (ME) e a margem de erro simultânea (SME). A primeira é utilizada quando se avalia apenas um parâmetro por vez, já a SME é usada quando se avalia mais de um parâmetro simultaneamente. Para ambos os casos, respostas abaixo da margem indicam que o efeito dos parâmetros não apresenta significância sob a robustez do método<sup>39</sup>.

Com base no gráfico obtido, é possível perceber que nenhum dos fatores ultrapassou a ME e a SME, portanto, pode-se afirmar que o método desenvolvido é robusto.

**Figura 12.** Gráfico de Lenth's. Fonte: Autoria própria.



### 5.7 Aplicação em amostras de efluentes hospitalares

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de fármacos em 4 amostras diferentes de efluentes hospitalares. As amostras não apresentaram picos cromatográficos nas regiões dos analitos estudados, salvo uma amostra que apresentou um pico na região referente a carbamazepina, porém não foi possível quantificar devido a concentração estar abaixo do valor de LOQ.

### 5.8 Comparação com estudos descritos na literatura

O método desenvolvido nesse trabalho também foi comparado com outros métodos reportados na literatura na determinação de fármacos em amostras de água, conforme mostrado na Tabela 14. É possível perceber que o método proposto faz uso de pequenos volumes de amostra e solvente, gerando baixa quantidade de resíduos. Além disso, o método requer poucos minutos para a realização do procedimento de preparo de amostras, o que leva a uma maior frequência analítica.

**Tabela 12.** Comparação do método proposto com estudos previamente reportados na literatura para a determinação de fármacos. Fonte: Autoria própria.

Técnica de preparo de amostra	Técnica de análise	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Tempo total de preparo de amostra (min)	Volume total de amostra e solvente (mL)	Referência
DPX	HPLC-DAD-FLD	30 <sup>e</sup> ; 300 <sup>d</sup> ; 1500 <sup>a</sup> ; 3030 <sup>b,c</sup>	10	0,8 – 0,1	Este estudo
SPE	HPLC-MS/MS	0,03 <sup>a</sup> ; 2,5 <sup>b</sup>	60	200 – 4	FANTUZZI, et al., 2018 <sup>40</sup>
SPME	HPLC-UV	50 <sup>b</sup> ; 500 <sup>c</sup>	17	2 -	WANG, et al, 2018 <sup>41</sup>
SBSE	LC-MS/MS	60 <sup>b</sup> ; 11,1 <sup>c</sup> ; 71 <sup>e</sup>	240	40 – 5	TANWAR, et al, 2015 <sup>42</sup>

<sup>a</sup>carbamazepina; <sup>b</sup>cetoprofeno; <sup>c</sup>diclofenaco; <sup>d</sup>losartana; <sup>e</sup>naproxeno

## **6 Conclusões**

Neste estudo foi desenvolvida uma metodologia analítica empregando o uso do biossorvente bráctea como fase extratora para DPX, com o objetivo de detectar e quantificar os fármacos carbamazepina, cetoprofeno, diclofenaco, losartana e naproxeno em amostras de efluentes hospitalares. O método apresentou resultados satisfatórios, com ótimos limites de detecção e quantificação, variando de 0,03 a 3,03  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,10 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Boas recuperações relativas dos analitos foram obtidas, com exceção apenas da losartana que apresentou recuperação relativa de 134% na concentração de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Através do método de robustez de Younden e da análise do gráfico de Leth's, conclui-se que o método é robusto, ou seja, pequenas variações dos parâmetros utilizados não afetam os resultados dos experimentos.

O método possui vantagens por utilizar baixos volumes de amostra e solvente, no qual reduz a quantidade de resíduos gerados pelas análises. O tempo total gasto para realização de todo o procedimento é relativamente pequeno, indicando uma boa frequência analítica. Além disso, o método utiliza como fase extratora um biossorvente natural, que apresentou uma eficiência de extração satisfatória, tornando-se uma alternativa para o descarte da bráctea ao meio ambiente.

## **7 Referências**

<sup>1</sup>BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**. 26, 4, 523-530, 2003.

<sup>2</sup>UEDA, J.; TAVERNARO, R.; MAROSTEGA, V., PAVAN, W. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente On-Line**. 5, 1, 2009.

<sup>3</sup>VAZ, K.V.; FREITAS, M.M.; CIRQUEIRA, J.Z. Investigação sobre a forma de descarte de medicamentos vencidos. **Cenarium Farmacêutico**. 4, 4, 2011.

<sup>4</sup>CARASEK, E., MERIB, J., Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**. 880, 8–25, 2015.

<sup>5</sup>BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. Definições. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/dcb/conceitos-e-definicoes>>. Acesso em: 24 de Outubro de 2018.

<sup>6</sup>BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA**. Medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos>>. Acesso em: 24 de Outubro de 2018.

<sup>7</sup>CARBAMAZEPINA. Campinas: Medley, 2016. Bula de remédio.

<sup>8</sup>CETOPROFENO. São Paulo: Eurofarma, 2017. Bula de remédio.

<sup>9</sup>DICLOFENACO. Campinas: Medley, 2018. Bula de remédio.

<sup>10</sup>NAPROXENO. Anápolis: Laboratório Teuto, 2018. Bula de remédio.

<sup>11</sup>LOSARTANA. Anápolis: Brainfarma, 2018. Bula de remédio.

<sup>12</sup>LIMA, D. R. S.; TONUCCI, M. C.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S. F. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Eng. Sanit. Ambient.** 22, 6, 1043-1054, 2017.

<sup>13</sup>BIENKOWSKI, B. Tratamento de esgotos falha na remoção de fármacos. **Scientific American Brasil**. Disponível em: <[https://www2.uol.com.br/sciam/noticias/tratamento\\_de\\_esgotos\\_falha\\_na\\_remocao\\_de\\_farmacos.html](https://www2.uol.com.br/sciam/noticias/tratamento_de_esgotos_falha_na_remocao_de_farmacos.html)>. Acesso em 02 de Novembro de 2018.

<sup>14</sup>DEZOTTI, M., BILA, D.M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, 30, 3, 651-666, 2007.

<sup>15</sup>YING, G.G.; KOOKANA, R.S.; KOLPIN, D.W. Occurrence and removal of pharmaceutically active compounds in sewage treatment plants with different technologies. **Journal of Environmental Monitoring**. 11, 1498-1505, 2009.

<sup>16</sup>DIAS, A.N. **Cortiça: uma nova abordagem como fase extratora para microextração em fase sólida e microextração em barra adsortiva**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

<sup>17</sup>MAGALHÃES, I.R.S.; OLIVEIRA, A.R.M.; BONATO, P.S. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, 1, 4, 11-17, 2009.

<sup>18</sup>OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, 31, 3, 637-644, 2008.

<sup>19</sup>MORÉS, L. **Introdução de uma fase biossorvente natural e renovável para a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) para a determinação de contaminantes emergentes em amostras de águas de lagos**. 2018. 70f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

<sup>20</sup>PINTO, M.A.L.; QUEIROZ, M.E.C. Extrações em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, 7, 2, 101-108, 2015.

<sup>21</sup>BORDIN, D.C.M.; ALVES, M.N.R.; CAMPOS, E.G.; MARTINIS, B.S. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**. 39, 6, 1017-1212, 2016.

<sup>22</sup>CHAVES, Andréa R. et al. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1399, p. 1-7, 2015.

<sup>23</sup>PINTO, Mônia Ap. Lemos; SOUZA, Israel D. de; QUEIROZ, Maria Eugênia C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116-124, 2017.

<sup>24</sup>CORAZZA, Gabriela et al. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 42-50, 2017.

<sup>25</sup>GUAN, Hongxia; BREWER, William E.; MORGAN, Stephen L.. New Approach to Multiresidue Pesticide Determination in Foods with High Fat Content Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10531-10538, 2009.

<sup>26</sup>HASEGAWA, Chika et al. Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography– mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 2, p. 563-570, 2007.

<sup>27</sup>GUAN, Hongxia; STEWART, Katelyn. Determination of Explosives in Water Using Disposable Pipette Extraction and High Performance Liquid chromatography. **Analytical Letters**, v. 47, n. 8, p. 1434-1447, mai. 2014.

<sup>28</sup>LADINO, J.A.F.; CEBALLOS, M.O.; MOREANO, M.R.; MONTANO, D.F.; CARDONA, W.; GIRALDO, L.F.; RICHTER, P. Ionic liquids intercalated in montmorillonite as the sorptive phase for the extraction of low-polarity organic compounds from water by rotating-disk sorptive extraction. **Analytica Chimica Acta**, 953, 23-31, 2017.

<sup>29</sup>MADRID, Y.; CÁMARA, C. Biological substrates for metal preconcentration and speciation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. 16, 1, 36-44, 1997.

<sup>30</sup>ALVES, V. N.; COELHO, N. M. M. Selective extraction and preconcentration of chromium using *Moringa oleifera* husks as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, 109, 16-22, 2013.

<sup>31</sup>RAMRAKHIANI, L., HALDER, A., MAJUNDER, A., MANDAL, A. K., MAJUMDAR, S. GHOSH, S. Industrial waste derived biosorbent for toxic metal remediation: Mechanism studies and spent biosorbent management. **Chemical Engineering Journal**. 308, 1048-1064, 2017.

<sup>32</sup>DIAS, A. N. et al. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**. 888, 59-66, 2015.

<sup>33</sup>BRASIL, J. L. et al. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on *Araucaria angustifolia* wastes. **Journal of Hazardous Materials**, 133, 1–3, 143-153, 2006.

<sup>34</sup>MICHELON, F. et al. *Araucaria Angustifolia*: A potential nutraceutical with antioxidant and antimutagenic activities. **Current Nutrition & Food Science**, 8, 3, 155-159, 2012.

<sup>35</sup>DO CARMO, S.N.; MERIB, J.; DIAS, A. N.; STOLBERG, J.; BUDZIAK, D. CARASEK, E. A low-cost biosorbent-based coating for the highly sensitive determination of

organochloride pesticides by solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, 1525, 23-31, 2017.

<sup>36</sup>COELHO, E.; FERREIRA, C.; ALMEIDA, C. M. M. Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by SPME-GC-FID in Environmental and Tap Waters. **Journal of Brazillian Chemical Society**, 19, 6, 1084-1097, 2008.

<sup>37</sup>KARAGEORGOU, E., SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, 1353, 131-139, 2014.

<sup>38</sup>AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Internacional: Maryland, 2016.

<sup>39</sup>LEONARDI, F., VESCHETTI, M., TONNARINI, S., CARDELLINI, F., TREVISI, R. A step towards accreditation: A robustness test of etching process. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 102, p. 93-97, 2015.

<sup>40</sup>FANTUZZI, G.; AGAZZOTTI, G.; RIGHI, E.; PREDIERI, G.; CASTIGLIONI, S.; RIVA, F.; ZUCCATO, E. Illicit drugs and pharmaceuticals in swimming pool waters. **Science of the total environment**, v 635, p. 956-963, 2018.

<sup>41</sup>WANG, R.; LI, W.; CHEN, Z. Solid phase microextraction with poly(deep eutectic solvent) monolithic column online coupled to HPLC for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Analytica Chimica Acta**, v 1018, p. 111-118, 2018.

<sup>42</sup>TANWAR, S.; CARRO, M.; MAGI, E. Innovative sampling and extraction methods for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 106, p. 100-106, 2015.  
and Isotopes, v. 102, p. 93-97, 2015.