

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REUSO DE CARTUCHOS NA ANÁLISE DE CEFALEXINA POR MEIO DA SPE

Vitória Nyland¹, Eniz Conceição Oliveira², Lucélia Hoehne³,
Giovana Wanessa Franke Bohn⁴

Resumo: Os antibióticos são pouco assimilados pelo organismo humano e, tem seu uso cada vez mais elevado no combate de infecções de diferentes tipos, assim, acabam sendo excretados e poluindo os ambientes aquáticos. A cefalexina é um exemplo desse tipo de fármaco, podendo ser pré-concentrada/extraída por meio da extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE). Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar o reuso dos cartuchos C18 de SPE na recuperação desse micropoluente. Foi preparada uma solução aquosa de 1000 mg/L de cefalexina e, partindo dela, soluções nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/L (em triplicata) em seguida realizou-se a leitura da absorvância por espectrometria de absorção molecular. Após, as amostras foram inseridas no equipamento de SPE para pré-concentrar o fármaco. As etapas para a extração foram o condicionamento do sorvente, a percolação da amostra, lavagem e a eluição dos analitos com solvente apropriado. Em seguida, as soluções foram ressuspensas em água e fez-se nova leitura da absorvância para comparar os resultados e verificar o percentual de recuperação obtido. Repetiu-se este procedimento duas vezes, sempre utilizando os mesmos cartuchos na análise e os resultados mostraram que na medida que se aumenta a concentração de cefalexina na solução, menor é sua recuperação. Além disso, na terceira análise, os valores de recuperação sofreram poucas alterações, indicando a estabilização da recuperação com os cartuchos já utilizados três vezes. Por tanto, a técnica SPE e o reuso dos cartuchos de extração C18 podem ser aplicados na pré-concentração da cefalexina.

Palavras-chave: Micropoluente. Extração em fase sólida. Fármaco.

1 Diplomada em Química Industrial pela Univates; vitoria.nyland@universo.univates.br

2 Doutora em Química Ambiental pela UFRGS; professora titular da Univates; eniz@univates.br

3 Doutora em Química pela UFSM; professora titular da Univates; luceliah@univates.br

4 Graduada em Biomedicina pela Univates; giovana.bohn@universo.univates.br

1 INTRODUÇÃO

Quando se fala em análises químicas, especialmente na análise de resíduos, se o analito está presente em uma concentração muito baixa e possui propriedades químicas diferentes e a matriz for complexa, é necessário realizar a etapa de preparação da amostra, a qual visa facilitar a extração do analito alvo e, frequentemente, promover sua concentração, além de remover o máximo de interferência possível (JARDIM, 2010).

A escolha correta da técnica de preparo de amostras é fundamental para se obter resultados confiáveis, logo, tanto a escolha da técnica quanto das condições experimentais deve ser feitas com extrema atenção, levando-se em consideração a natureza da amostra, a matriz, as características e técnicas de análise dos analitos a serem usados na determinação (JARDIM, 2010).

A extração em fase sólida (EFS) do inglês *solid phase extraction* (SPE) é uma técnica de análise que vem sendo aplicada na extração e pré-concentração de compostos orgânicos e exige que a etapa de preparo de amostras seja realizada com eficiência, para que os resultados obtidos sejam os mais precisos possíveis (JARDIM, 2010).

Esta técnica de análise possibilita a concentração de compostos que estão presentes nas amostras de sangue, urina e águas em concentrações baixíssimas (JÚNIOR *et al.*, 2018). Constitui-se em passar entre 2 e 2000 mL de uma amostra líquida por um cartucho que contém um adsorvente específico para aquela amostra. Após isso, é percolado um solvente orgânico pelo cartucho para que este libere os compostos que ficaram retidos (FARIA, 2019).

Lanças (2004, p. 2) em seu livro “Extração em Fase Sólida” define a SPE como:

[...] técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. Do ponto de vista prático, a SPE, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida.

Além da definição citada, Cunha (2005) divide a SPE em três grupos, a SPE de fase reversa é aquela utilizada na extração de analitos apolares contidos em matrizes polares, normalmente, em água e neste tipo de extração o material de interesse extraído é eluído com solvente orgânico. Já na SPE de fase normal, isola-se substâncias polares de matrizes apolares, como óleo vegetal dissolvido em hexano por exemplo e por fim Cunha (2005) afirma que a SPE de troca iônica é aplicada quando o objetivo é extrair compostos iônicos através do ajuste do potencial hidrogeniônico (pH).

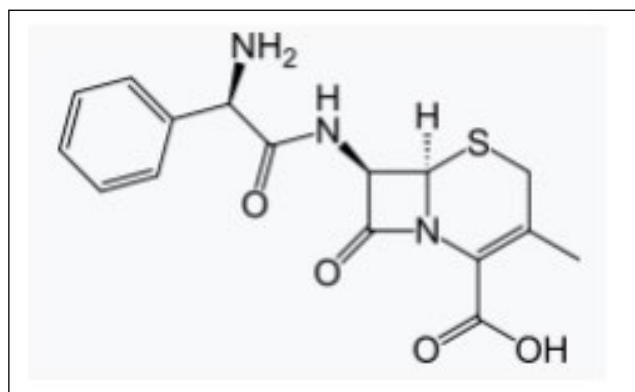
Na extração de fase reversa aplica-se, geralmente, como fase sólida o octadecilsilano, mais conhecido como C18, em função deste apresentar boa seletividade e eficiência no processo de extração. O material contido no cartucho a ser utilizado na análise, deve primeiramente, ser ativado, para que seja possível obter uma boa extração, o que requer o cuidado de não deixar o solvente dentro do cartucho secar, evitando com isso, que caminhos preferenciais sejam formados, o que comprometeria o processo de separação (LANÇAS, 2004).

A SPE tem sido escolhida para extrair micropoluentes de águas residuais por apresentar várias vantagens, tais como: menor quantidade de resíduos tóxicos, menor consumo de solvente orgânico, facilidade de automação, não formação de emulsões, porcentagens elevadas de recuperação do analito, capacidade de aumentar a seletividade do analito e a disponibilidade comercial dos equipamentos e sorventes aplicados (JARDIM, 2010). É uma técnica que consiste em quatro fases: o condicionamento do sorvente, a percolação da amostra, a lavagem e a eluição dos analitos com solvente apropriado (LANÇAS, 2004). No entanto, não há relatos na literatura sobre a reutilização de seus cartuchos e recheios para novas análises. O que se torna importante, em se tratando de meio ambiente, no sentido de verificar essa possibilidade de reuso, sem impactar em análises incorretas.

A SPE tem uma aplicação muito grande na pré-concentração e extração de antibióticos, exemplos de fármacos naturais ou sintéticos que impossibilitam o crescimento ou causam a morte de fungos ou bactérias, sendo aplicados como medicamentos no tratamento de doenças bacteriológicas e muitas vezes acabam poluindo os meios aquáticos (SILVA, 2018).

Dentre estes fármacos, a cefalexina tem sido indicada para o tratamento de infecções do trato respiratório, infecções da pele, ósseas e otite, se tratando de uma cefalosporina de primeira geração, que pertence ao grupo dos antibióticos beta-lactâmicos clássicos, sendo formada pela junção entre os compostos fenilglicina com o ácido 7-amino desacetoxicefalosporânico (7-ADCA) (AHN, 2019). Na Figura 1 é possível observar a estrutura da cefalexina.

Figura 1 - Estrutura da Cefalexina.



Fonte: Ahn (2019, p. 13).

A cefalexina é um pó branco com odor característico, pouco solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol, clorofórmio e éter, apresentando, em sua estrutura, os grupos funcionais amina, amida, tioéter e ácido carboxílico, e além desses grupos, há também a presença de uma cadeia lateral, formada por uma amina primária, uma amida e um anel benzênico (AHN, 2019). A cefalexina pode ser pré-concentrada por meio da técnica de SPE, sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de reuso dos cartuchos C18 de SPE na recuperação deste micropoluente.

2 METODOLOGIA

Preparou-se a solução estoque de cefalexina, a partir de um padrão (marca Sigma, n° CAS: 15686-71-2), diluindo 0,1 g do padrão em 100 mL de água ultrapura, obtendo uma solução de 1000 mg/L, em seguida partindo-se dessa solução, preparou-se as soluções para curva de calibração e fez a varredura por meio da espectrometria de absorção molecular em espectrofotômetro (marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10S UV-Vis), para verificar qual o comprimento de onda adequado para realizar as leituras das amostras.

A partir da solução de 1000 mg/L (solução estoque) preparou-se, em triplicata, três soluções de trabalho nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/L, as quais também foram lidas no espectrofotômetro de absorção molecular. O pico de maior intensidade foi no comprimento de onda de 262 nm. Após, acoplou-se os cartuchos do tipo Strata-X (C18) no equipamento de SPE (*manifold* - marca Agilent) e conectou-o a uma bomba de vácuo (marca Arconi, modelo MA-058) para realização da extração/pré-concentração.

Percolou-se pelos cartuchos 6 mL de metanol puro (marca Merck) seguido de 6 mL de água purificada, após passou-se as soluções de cefalexina, em triplicada, pelos cartuchos (100 mL), conforme representa a Figura 2. Ao

término, foi percolado 6 mL de metanol 5% em água, deixando secar por 5 minutos, decorrido este tempo, foram acoplados dentro do *manifold* os tubos de ensaio para coleta da matriz de interesse e após, percorreu-se novamente 6 mL de metanol puro.

Figura 2 - Soluções de cefalexina sendo pré-concentradas pela SPE.



Fonte: da Autora (2021).

Ao término da pré-concentração foi realizada a evaporação do metanol contido em cada tubo de ensaio, por meio do fluxo de nitrogênio. Após, ressuspendeu-se o resíduo dos tubos de ensaio com 10 mL de água ultrapura e agitou-se cada tubo de ensaio em vórtex por 2 minutos, para garantir uma melhor homogeneização. Posterior a esta etapa, realizou-se, novamente, a leitura da absorbância por meio da espectrofotometria de absorção molecular a fim de verificar o percentual de recuperação obtido, no comprimento de onda de 262 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de absorbância (A) obtidos por meio da espectrofotometria de absorção molecular em 262 nm, nas soluções de concentrações 1, 5 e 10 mg/L, pré-concentradas por SPE da cefalexina (cada uma delas em triplicata), sempre utilizando os mesmos cartuchos, estão dispostos na Tabela 1. Cabe ressaltar que ao evaporar, com o fluxo de nitrogênio, as soluções de concentração 1 mg/L na primeira vez que se fez a análise, houve perda destas, e por consequência não foi possível calcular o percentual de recuperação neste caso.

Tabela 1 – Absorbância, em 262 nm, obtida em cada concentração analisada três vezes com os mesmos cartuchos de extração.

SPE	Concentração (mg/L)	A (antes da SPE)	A (depois da SPE)
1°	1	0,017±0,001	-
	5	0,102±0,001	0,786±0,007
	10	0,217±0,002	1,141±0,011
2°	1	0,025±0,001	0,171±0,002
	5	0,105±0,001	0,408±0,003
	10	0,216±0,001	0,719±0,004
3°	1	0,024±0,002	0,153±0,001
	5	0,111±0,001	0,374±0,003
	10	0,221±0,002	0,685±0,005

Fonte: das Autoras (2021).

Partindo dos valores apresentados na Tabela 1, obteve-se o percentual de recuperação da cefalexina para cada concentração analisada, conforme está representado na Tabela 2. A metodologia foi feita de acordo com González, *et al.* (1999).

Tabela 2 - Percentual de recuperação da cefalexina nas diferentes concentrações.

SPE	Concentração (mg/L)	Recuperação (%)
1°	1	-
	5	76,83
	10	52,44
2°	1	67,31
	5	38,64
	10	33,31
3°	1	63,75
	5	34,00
	10	30,99

Fonte: da Autora (2021).

Pode-se perceber que conforme a concentração da cefalexina aumenta, tem-se a diminuição do percentual de recuperação, isso em todas as vezes três pré-concentrações realizadas.

Neste contexto, Oliveira (2019) no desenvolvimento de seu mestrado investigou a eficiência da metodologia SPE na recuperação de alguns fármacos mais utilizados e conhecidos para o tratamento de diferentes tipos de infecções. A autora utilizou cartuchos com recheio de C18 e obteve recuperações de 84,2 à 91,3%, concluindo que aplicar a SPE para pré-concentrar fármacos é uma boa alternativa, principalmente por se tratar de uma metodologia de baixo custo.

Já Martín *et al.* (2011) analisaram seis fármacos por meio da SPE, a fim de averiguar a recuperação destes em meio de água ultrapura, utilizando cartuchos de extração com recheio C18 e obtiveram um percentual de recuperação de 74 a 93%. Os autores concluíram que a técnica de SPE permite obter uma recuperação significativa para os fármacos em geral.

4 CONCLUSÃO

As recuperações verificadas neste trabalho mostraram-se mais baixas se comparadas à trabalhos desenvolvidos por outros autores, porém ainda assim podem ser consideradas eficientes, bem como o reuso dos cartuchos de extração, apesar de apresentarem menor grau de recuperação. Considerando os resultados, o reuso dos cartuchos pode ser uma alternativa conveniente, ao ser aplicada com a técnica de SPE, devido o baixo custo de desenvolvimento.

Ficam como sugestões de melhoria para alcançar maiores níveis de recuperação, avaliar outros tipos de cartuchos e solventes utilizados ao longo da metodologia, além de verificar outro método para leitura final da recuperação, como por exemplo, a utilização de cromatografia.

REFERÊNCIAS

AHN, Alessandra Von. **Avaliação do perfil de degradação do fármaco cefalexina na forma farmacêutica cápsula**. Instituto Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Química. Porto Alegre, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/209938>. Acesso em: 14 out 2021.

CUNHA, Ana Cristina Borba da. **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de fármacos e pesticidas em amostras aquosas ambientais**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, janeiro de 2005. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/4683/000458792.pdf?sequence=1>. Acesso em: 19 set 2021.

FARIA, Anizio Marcio da. **Apostila de Experimentos de Análise Instrumental II**. Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

GONZÁLEZ, A. G *et al.* Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914098002719>. Acesso em: 18 fev.2022.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas.** *Scientia Chromatographica*, Vol.2, N°1, Instituto Internacional de Cromatografia, 2010. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n1a2.pdf>. Acesso em: 06 out. 2021.

JÚNIOR, Carlos A. S. Aguiar; *et al.* **Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um solvente de menor retenção.** *Química Nova*, v. 41, N. 6, São Paulo, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170223>. Acesso em: 27 set 2021.

LANÇAS, Fernando M. **Extração em Fase Sólida (SPE).** Editora RiMa, São Paulo, 2004.

MARTÍN, J *et al.* Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. **National Center for Biotechnology Information.** *Talanta*, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21645748/>. Acesso em: 18 out. 2021.

OLIVEIRA, A. T. L. B. Extração e quantificação de fármacos em matrizes aquosas. **Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança.** Bragança, 2019. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/20526/1/pauta-relatorio-29.pdf>. Acesso em: 19 out. 2021.

SILVA, Challyne Carolina. **Reações alérgicas à penicilina.** Fundação Carmelitana Mário Palmério. Trabalho de Conclusão de Curso. Monte Carmelo, 2018. Disponível em: <http://repositorio.fucamp.com.br/jspui/handle/FUCAMP/336>. Acesso em: 04 out. 2021.