

**I-094 - ANÁLISE DE RESÍDUOS DOS FÁRMACOS PARACETAMOL,
IBUPROFENO, ATENOLOL, SINVASTATINA, CLONAZEPAM E
CARBAMAZEPINA POR LC-MS/MS - VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA**

Camila Delanesi Guedes⁽¹⁾

Farmacêutica-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Mestranda em Saúde Ambiental na Faculdade de Saúde Pública de Universidade de São Paulo. Perita Criminal da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo.

Wanderley da Silva Paganini⁽²⁾

Engenheiro Civil pela UNESP de Bauru/SP, Engenheiro Sanitarista, Mestre e Doutor em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - USP, Livre-Docente em Saneamento Básico e Ambiental pela Faculdade de Saúde Pública da USP. Superintendente de Gestão Ambiental da Diretoria de Tecnologia, Empreendimentos e Meio Ambiente da SABESP e Professor Associado do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Endereço⁽¹⁾: Rua Moncorvo Filho, 410 - Butantã – São Paulo - SP - CEP: 05507-060 - Brasil - Tel: (11) 3811-7166 - e-mail: camila.cdg@usp.br

RESUMO

A preocupação com a presença de fármacos como contaminantes de ambientes aquáticos se iniciou na década de 1970 e, desde então, inúmeros estudos foram realizados e revelaram a presença de resíduos de tais substâncias, podendo-se citar antibióticos, hormônios, anestésicos, anti-inflamatórios, dentre outros, em diversas partes do mundo, sendo eles denominados atualmente contaminantes ambientais emergentes. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia analítica, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), validando-a, para a quantificação de resíduos dos fármacos paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina, simultaneamente, em amostras aquosas, com vistas a sua utilização na análise de afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgotos. Os resultados obtidos indicaram um método rápido, específico e sensível para a análise de resíduos dos fármacos paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina, fármacos estes com alta incidência de utilização no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Fármacos, resíduos, cromatografia líquida, espectrometria de massas, validação analítica.

INTRODUÇÃO

A preocupação com a presença de fármacos como contaminantes de ambientes aquáticos se iniciou na década de 1970 e, desde então, inúmeros estudos foram realizados e revelaram a presença de resíduos de tais substâncias, podendo-se citar antibióticos, hormônios, anestésicos, anti-inflamatórios, dentre outros, em diversas partes do mundo, sendo eles denominados atualmente contaminantes ambientais emergentes. Os fármacos, após passarem pelo organismo humano, irão atingir os esgotos devido à excreção humana, ou ainda podem chegar diretamente até eles devido ao aporte clandestino ou incorreto de medicamentos diretamente na rede de esgotos.

O Brasil é um grande consumidor mundial de medicamentos, e segundo o Instituto Brasileiro de Opinião e Estatística (IBOPE), este mercado movimentou montantes superiores a R\$ 70 bilhões por ano, sendo estimado um gasto médio anual, por brasileiro, em torno de R\$ 430,92.

Desta forma, torna-se imprescindível a pronta disponibilidade de método analítico seletivo, rápido e de alta sensibilidade, capaz de identificar e quantificar, simultaneamente, resíduos de fármacos na fase aquosa de esgoto bruto e tratado.

Os fármacos selecionados para este estudo foram paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina. Eles apresentam alta incidência de uso pela população (SIMÕES e FILHO, 1998; ENCONTRO CEPAL, 2003; PHARMA, 2012; FIOCRUZ, 2012), sendo este o principal motivo para terem sido selecionados para este estudo.

O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologia analítica, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), validando-a, para a quantificação de resíduos dos fármacos paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina, simultaneamente, em amostras aquosas, com vistas a sua utilização na análise de afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgotos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo dos padrões

Foram preparadas soluções de calibração dos fármacos paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina, a partir de padrões primários destas substâncias, com concentrações variando de 2 a 2000 µg/mL.

Equipamentos e condições cromatográficas

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent Technologies (1200 series), constituído por degaseificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1367B) e forno de coluna (G1330B). O detector usado, acoplado ao cromatógrafo, foi o espectrômetro de massas triploquadrupolo Q-trap 3200, da marca Applied Biosystems, com ionização à pressão atmosférica por electrospray.

Para a fase cromatográfica empregou-se coluna analítica Phenomenex Synergi Hidro-RP 80Å, com 50 milímetros de comprimento, 2 milímetros de diâmetro interno e tamanho de partícula de 5 µm, com pré-coluna equivalente, e mantidas a 30 °C durante a análise. A fase móvel utilizada foi um gradiente com tampão ácido fórmico/formiato de amônio e acetonitrila, conforme tabela 01, com vazão de 300 µL/min, previamente filtrada sob vácuo, utilizando-se membrana própria de 0,45 µm de diâmetro de poro. O volume de amostra injetado foi de 30 µL.

Tabela 01 - Gradiente aplicado na fase móvel.

TEMPO (MIN)	TAMPÃO ÁCIDO FÓRMICO / FORMIATO DE AMÔNIO	ACETONITRILA	FLUXO DA FASE MÓVEL (µL/MIN)
0	90%	10%	300
12,00	20%	80%	300
13,00	90%	10%	300
17,00	90%	10%	300

Validação Analítica: para a validação metodológica foram avaliados os parâmetros de seletividade/especificidade, linearidade e intervalo, exatidão, precisão, sensibilidade e robustez. O procedimento de validação foi baseado nos preceitos constantes na Resolução – RE nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Curvas de Calibração: foram estabelecidas curvas de calibração para cada fármaco estudado, sendo determinadas a partir do preparo de soluções de calibração em, no mínimo, 05 diferentes concentrações na faixa de concentrações acima especificadas.

RESULTADOS OBTIDOS

Através de infusões diretas dos padrões dos fármacos em estudo, no espectrômetro de massas, separadamente e sequencialmente, foram obtidos os espectros de massa de cada um deles, todos obtidos por ionização através de electrospray, no modo positivo (ESI+).

As transições iônicas (íon precursor > íon produto) escolhidas para a identificação e quantificação dos fármacos estão expressas na Tabela 02, uma vez que foram as que resultaram em sinais mais intensos no modo de trabalho MRM.

Tabela 02: Identificação dos fragmentos iônicos para identificação e quantificação dos fármacos (fragmentos de maior intensidade).

	Pares iônicos para identificação (m/z)	Pares iônicos para quantificação (m/z)
Paracetamol	152,2/110,1; 152,2/109,6	152,2/110,1
Ibuprofeno	207,2/161,1; 207,2/119,1	207,2/161,1
Atenolol	267,3/145,1; 267,3/74,1	267,3/145,1
Sinvastatina	419,4/199,3; 419,4/173,3	419,4/199,3
Carbamazepina	237,2/194,2; 237,2/193,1	237,2/194,2
Conazepam	316,1/270,2; 316,1/214,2	316,1/270,2

As condições ideais do espectrômetro de massas, estabelecidas para análise dos fármacos em pauta, estão abaixo descritas:

- modo de ionização da fonte: electrospray no modo positivo;
- voltagem do cone: 4500 volts;
- energias de colisão: paracetamol 21 volts; ibuprofeno 13 volts; atenolol 33 volts; sinvastatina 29 volts; carbamazepina 29 volts e clonazepam 39 volts;
- temperatura da fonte: 450° C.

ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Na fase cromatográfica obtiveram-se bons resultados com o uso da coluna analítica Phenomenex Synergi-RP Hydro (C-18, 50 x 2 mm e partícula de 5 µm), mantida a 30° C. A fase móvel utilizada foi um gradiente, iniciando-se com a proporção de 90% do tampão ácido fórmico/formiato de amônio e 10% de acetonitrila, invertendo-se a polaridade para 20% do tampão ácido fórmico/formiato de amônio e 80% de acetonitrila até 12 minutos, com um fluxo de 300µL por minuto. O cromatogramas, com os tempos de retenção (RT) e a identificação de cada fármaco estão na figura 01.

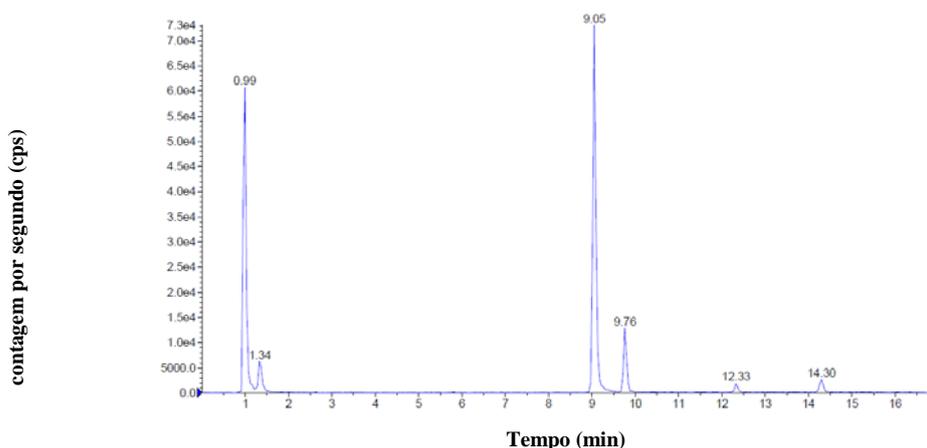


Figura 01: Cromatograma dos padrões dos fármacos: Atenolol RT=0,99 min; Paracetamol RT= 1,34 min; Carbamazepina RT=9,05 min; Clonazepam RT=9,76 min; Ibuprofeno RT=12,33 min; Sinvastatina RT=14,30 min.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Seletividade/Especificidade

A metodologia desenvolvida por LC-MS/MS no modo MRM já é por si só seletiva e específica uma vez que as massas moleculares dos compostos são selecionadas em Q1 e os fragmentos, oriundos da quebra destas moléculas previamente selecionadas, são identificados em Q3. Isso foi comprovado através da análise de inúmeros brancos, que não mostraram existência de qualquer interferente capaz comprometer a identificação inequívoca dos compostos.

Linearidade e intervalo

As linearidades foram estabelecidas com sucesso, para os seis fármacos estudados, sendo que as faixas de trabalho, e os coeficientes de determinação (r^2) e de correlação (r) estão mostradas na Tabela 03.

As curvas de calibração obtidas estão ilustradas nas figuras 02 a 07.

Tabela 03: Faixas de concentração, coeficientes de determinação (r^2) e de correlação (r) para cada fármaco.

	Faixas de concentração ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de determinação (r^2)	Coefficiente de correlação (r)
Paracetamol	0,1 a 40	0,9953	0,9976
Ibuprofeno	50 a 1000	0,9994	0,9997
Atenolol	0,5 a 80	0,9826	0,9913
invastatina	1 a 100	0,9982	0,9991
Clonazepam	0,5 a 80	0,9989	0,9994
Carbamazepina	0,1 a 25	0,9996	0,9998

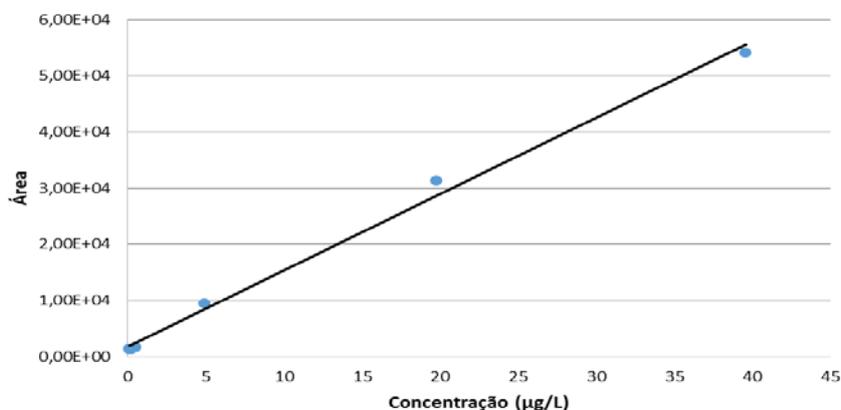


Figura 02 - Curva de calibração do paracetamol, na faixa concentração: 0,1 a 40 $\mu\text{g/L}$

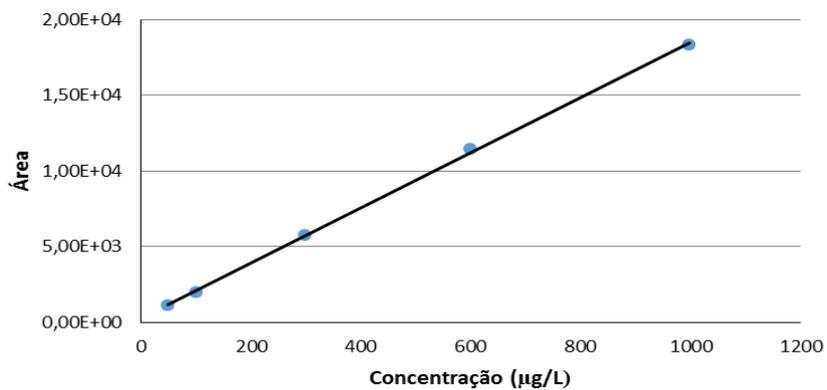


Figura 03 - Curva de calibração do ibuprofeno, na faixa concentração: 50 a 1000 µg/L.

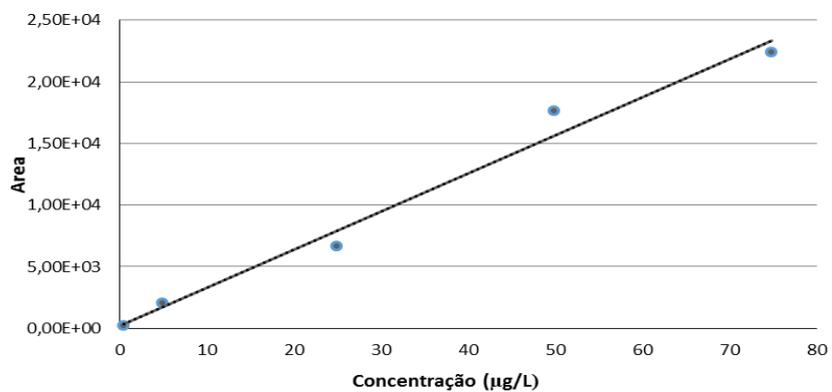


Figura 04 - Curva de calibração do atenolol, na faixa concentração: 0,5 a 80 µg/L.

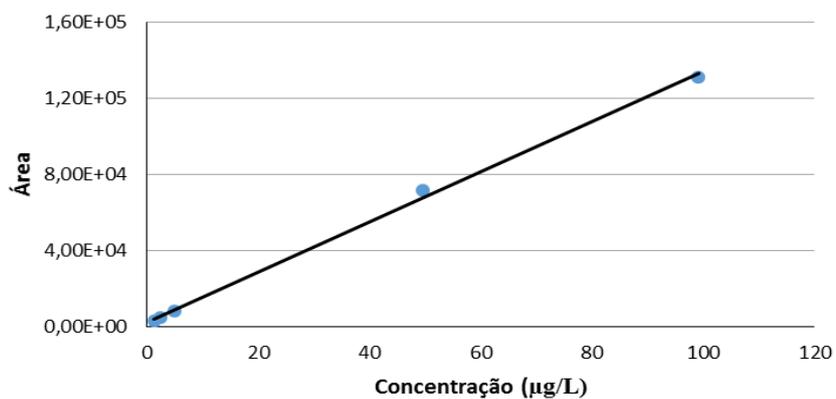


Figura 05 - Curva de calibração da sinvastatina, na faixa concentração: 1 a 100 µg/L.

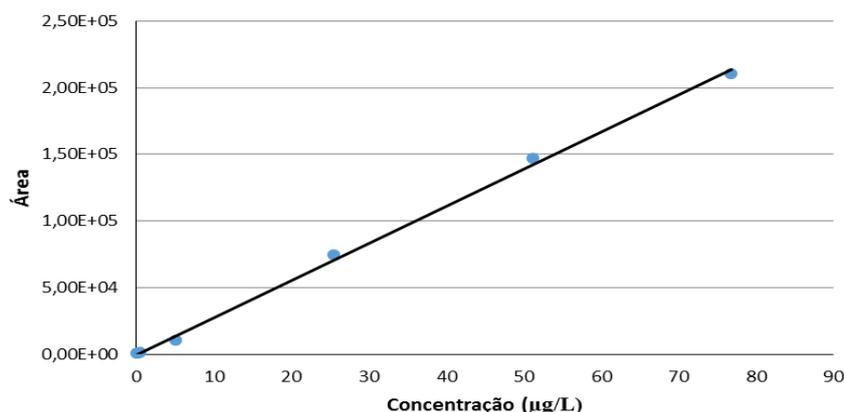


Figura 06 - Curva de calibração do clonazepam, na faixa concentração: 0,5 a 80 µg/L.

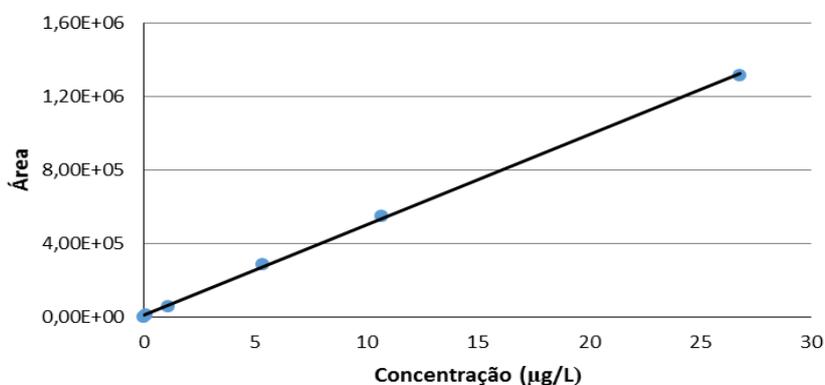


Figura 07 - Curva de calibração da carbamazepina, na faixa concentração: 0,1 a 25 µg/L.

Precisão e Exatidão

A precisão foi determinada através de ensaios de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária, sendo demonstrada através do coeficiente de variação médio (CV%) das triplicatas de 03 diferentes concentrações analisadas em um mesmo dia e em dias distintos, sendo tais valores expressos na Tabela 04, abaixo.

Tabela 04: Dados referentes à precisão e exatidão.

	Repetibilidade (CV _{médio} %)	Precisão intermediária (CV _{médio} %)	Exatidão (Recuperação média %)
Paracetamol	5,39	4,13	106,52%
Ibuprofeno	8,53	10,87	99,5%
Atenolol	3,14	6,83	102,5%
Sinvastatina	3,75	2,64	102,28%
Clonazepam	2,31	10,14	108,0%
Carbamazepina	2,32	2,74	102,3%

Limites de detecção e de quantificação

Utilizando-se os parâmetros da curva de calibração, pode-se definir os limites de quantificação e de detecção para cada um dos fármacos em estudo. Esta forma de determinar tais parâmetros é estatisticamente mais confiável para métodos cromatográficos, uma vez que o ruído não é constante durante toda a faixa linear.

A menor concentração do paracetamol capaz de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis foi 3,84 µg/L, sendo este o limite de quantificação (LOQ) do método para esta substância. Já seu limite de detecção (LOD) foi 1,27 µg/L.

Para o ibuprofeno, o LOQ estabelecido foi 219 µg/L, e o LOD 72 µg/L, valores consideravelmente maiores que os limites para os outros fármacos o que demonstra uma menor sensibilidade desta técnica analítica na análise de ibuprofeno.

Em relação ao atenolol, o LOQ estabelecido foi 3,13 µg/L, e o LOD 1,03 µg/L.

Para a sinvastatina o limite de quantificação foi 2,48 µg/L e o de detecção, 1,24 µg/L.

E, finalmente, para o clonazepam e a carbamazepina, foi estabelecido LOQ de 2,27 µg/L e 2,02 µg/L e LOD de 0,75 µg/L e 0,67 µg/L, respectivamente.

Tanto o limite de quantificação quanto o limite de detecção atingiram valores baixos o suficiente para atender às normativas internacionais e às propostas de normativas nacionais na análise de fármacos em amostras de efluentes de estações de tratamento de esgotos.

Para a robustez, aplicou-se variações pré-estabelecidas de fluxo e temperatura às condições cromatográficas anteriormente otimizadas, e foi verificado que este método tolera bem tais variações, para os fármacos em estudo.

Já a variação da composição da fase móvel não foi tolerada (tabela 05).

Tabela 05 - Dados dos testes de robustez.

	VARIAÇÃO 1	VARIAÇÃO 2	VARIAÇÃO MÁX. RT (%)	CV MÁXIMO (%)	VARIAÇÃO MÁX. RECUP. (%)
Fase móvel	Tampão:Acetonitrila (88%:12%)	Tampão:Acetonitrila (92%:8%)	0,90	10,5	31,2
Fluxo	294 µL/min	306 µL/min	2,5	6,5	9,6
Temperatura	21 °C	19 °C	0,80	1,4	6,5

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, verificou-se que o método desenvolvido e validado apresentou:

- Seletividade adequada, por não apresentar sinal (ou seja 'pico') nos tempos de retenção esperados para os analitos (fármacos), quando da injeção de inúmeros brancos;
- O parâmetro linearidade foi satisfatório para análise de resíduos dos seis fármacos, demonstradas através dos coeficientes de determinação (r^2) e de correlação (r) não inferiores a 0,98;
- Precisão aceitável para níveis residuais, demonstrada através dos coeficientes de variação máximos (CV%) obtidos tanto para a repetibilidade, quanto para a precisão intermediária, que não excederam 20% (BRITO et al, 2003);
- Exatidão dentro dos intervalos aceitáveis, de acordo com Ribani e Lanças, explicitada pelas recuperações obtidas, que não excederam o limite 70% à 120%;
- Sensibilidade alta, já que os limites de quantificação e de detecção obtidos foram da ordem de poucos microgramas por litro (µg/L – partes por bilhão), valores esses bastante baixos e compatíveis com os resultados de detecção de fármacos em esgoto relatados na literatura;

- Robustez estabelecida para o método, sendo toleradas pequenas variações de fluxo e de temperatura. Não foram toleradas, porém, as variações na composição da fase móvel testadas. Isso se deve ao fato que as ionizações das moléculas podem variar consideravelmente dependendo, dentre outros fatores, da composição da fase móvel (MORAES e LAGO, 2003).

Desta forma, o método mostrou-se rápido, específico e sensível para a análise de resíduos dos fármacos paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina.

A remoção de fármacos pelos sistemas convencionais de tratamento de esgotos nem sempre se mostra eficaz, de acordo com a literatura científica mundial (AQUINO et al., 2013; JONES et al, 2005; PAL et al, 2010; GAO et al., 2012; GROS et al. 2010). Ao mesmo tempo, o rigor de normativas para o lançamento dos efluentes nos corpos hídricos tem aumentado, e que torna necessária a pronta disponibilidade de métodos analíticos validados, rápidos e capazes de detectar quantidades ínfimas desses compostos nos afluentes e efluentes de ETEs, tornando-se base para a avaliação da eficácia do tratamento de esgoto na remoção destes compostos. Neste contexto, o desenvolvimento e validação da metodologia de análise de fármacos amplamente utilizados pela população, por LC-MS/MS, são importantíssimos.

Além de fornecer um método que pode ser prontamente utilizado na caracterização de afluentes e efluentes de ETEs, em relação ao paracetamol, ibuprofeno, atenolol, sinvastatina, clonazepam e carbamazepina, este estudo estimula, ainda, o desenvolvimento de outros métodos, envolvendo outros fármacos, considerando-se o amplo rol de substâncias utilizadas na terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AQUINO, S.F., BRANDT, e.m.f., CHERNICHARO, C.A.L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 18, n. 3, p. 187-204, jul/set 2013.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
3. ENCONTRO INTERNACIONAL DE ATRAÇÃO DE INVESTIMENTO DIRETO EXTERNO, 2003. Documento setorial – fármacos. Brasil: CEPAL – Comissão econômica para a América Latina e o Caribe, 2003. Disponível em: <http://www.eclac.org/publicaciones>. Acesso em: 20 mar. 2013.
4. FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz: Farmanguinhos Instituto de Tecnologia em Fármacos. Notícias (24 set. 2012). Disponível em: <http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos>. Acesso em: 25 maio 2013.
5. GAO, P., et al. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: mass balance and removal processes. Chemosphere, v. 88, p. 17-24, 2012.
6. GROS, M., et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. Environmental international, v. 36, p. 15-26, 2010.
7. JONES, O.A.H., VOULVOULLIS, N., LESTER, J.N. Human Pharmaceuticals in wastewater treatment processes. Critical reviews in environmental science and technology, v. 35, p. 401-427, 2005.
8. LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos : RiMa, 62p., 2004.
9. MORAES, M. C.; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por electrospray aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*. V. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.
10. PAL A., et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. Science of total environment, v. 408, p. 6062-6069, 2010.
11. PHARMA Portal Farmacêutico. Notícias - setor farmacêutico (22 maio 2012). Disponível em: <http://pfarma.com.br/noticia-setor-farmacutico/mercado/876-10-medicamentos-genericos-mais-consumidos-2011.html>. Acesso em: 10 maio 2013.
12. SIMÕES M. J. S., FILHO A. F. Consumo de medicamentos em região do Estado de São Paulo (Brasil), 1985. Rev. Saúde Pública. V. 22, n. 6, p. 494 – 499, 1988.