

ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS EM PEIXE EMPREGANDO MSPD E LC-ESI-MS/MS

GABRIEL IANZER HERTZOG¹; ANA LAURA VENQUIARUTI ESCARRONE²;
SERGIANE SOUZA CALDAS²; EDNEI GILBERTO PRIMEL³

¹Universidade Federal do Rio Grande - hertzoggabriel@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande - anaescarrone@yahoo.com.br;
sergianecaldas@hotmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande - eprimelfurg@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A contaminação dos meios hídricos gera preocupação frente ao impacto ambiental destes compostos no meio. Devido a processos físico-químicos os contaminantes presentes no meio podem se aderir a diferentes componentes do meio, atingindo o solo, o sedimento e os organismos que neles vivem.

Os peixes são espécies importantes no meio visto que podem bioacumular e biomagnificar compostos presentes no meio, desta forma os peixes podem fornecer dados da contaminação do meio, assim podendo ser utilizados como biomarcadores da qualidade da água. Cabe salientar também, que os contaminantes podem gerar efeitos tóxicos aos peixes e devido ao processo de biomagnificação podem transportar esses contaminantes presentes no meio ao homem via alimentação (DÓREA, 2008).

Considerando estes, diferentes métodos de preparo de amostras são utilizados para quantificação de contaminantes no meio ambiente. Desenvolver e propor melhorias a métodos já existentes são necessários e têm demonstrado importância na evolução da química analítica e ambiental principalmente para análise traço. Neste contexto métodos de preparo de amostras como a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (do inglês, *matrix solid phase dispersion*, MSPD), desenvolvidos com a finalidade de extrair-se compostos orgânicos de matrizes alimentícias (BARKER *et al.*, 1989) encaixam-se na necessidade supracitada.

Para determinação de compostos orgânicos as técnicas cromatográficas têm maior relevância, com destaque para Cromatografia Líquida com Ionização por Eletrospray Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-ESI-MS/MS), desta forma o objetivo deste trabalho foi estudar a extração de fármacos de diferentes classes terapêuticas em amostras de peixe (tainha - *Mugil platanus*) empregando MSPD com determinação por LC-ESI-MS/MS).

2. METODOLOGIA

A MSPD utilizada neste estudo baseou-se no método aplicado por SOARES (2012) e CALDAS et al. (2013). A fim de avaliar a MSPD como método de preparo de amostras para extração de fármacos de músculo de tainha, foram otimizados qualitativamente agente dispersor, solvente e uso de sal e ainda estes quantitativamente, avaliando também massa de amostra e os tempos de agitação.

Nas otimizações qualitativas foram testados agentes dispersores alternativos além de C18, Terra diatomácea, quitosana, quitina (obtidos de exoesqueletos de crustáceos), florisil e casca de mexilhão dourado, como solventes foram testados acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), MeOH/H₂O (1:1 v/v), ainda os dois últimos acidificados a 0,1% de ácido acético (CH₃COOH).

Para que se avaliasse a influência de cada variável independente e otimizasse estas no processo de extração dos fármacos do músculo de tainha pela MSPD, aplicou-se a ferramenta estatística do planejamento fatorial.

A separação, identificação e quantificação dos fármacos de interesse se deram por LC-ESI-MS/MS, usando coluna Kinetex C18 (3.0 mm x 50 mm d.i., 2.6 µm) da Phenomenex. Diferentes fases móveis foram avaliadas para melhores resoluções cromatográficas dos analitos estudados.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Para análise cromatográfica foram testados como solventes de eluição, MeOH, H₂O acidificada 0,1% CH₃COOH, H₂O acidificada 0,1% ácido fórmico (HCOOH), ACN e ACN acidificada 0,1% HCOOH, obtendo-se como condição ótima de eluição ACN acidificada 0,1% HCOOH/H₂O acidificada 0,1% HCOOH, ainda foi avaliado o gradiente de eluição, e se obteve a melhor condição para separação cromatográfica dos analitos de interesse com tempo de corrida de 16 minutos (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente de eluição cromatográfica

Tempo (min.)	H ₂ O (0,1% HCOOH) (%)	ACN (0,1% HCOOH) (%)
0	80	20
10	20	80
10,5	80	20
16	80	20

Na MSPD as condições iniciais testadas foram 0,5g (±0,01) de amostra, 1g (±0,01) de agente dispersor, 1g (±0,01) sal, maceração por 5 minutos, adição de 5mL de solvente, 1 minuto de agitação em vortex e centrifugação por 10 minutos a 5000rpm e recolhido 1mL do extrato para análise cromatográfica. Para todos testes foi aplicado teste de ANOVA e os compostos que tiveram diferença estatística nas extrações foram selecionados como ótimos. Sendo estes, terra diatomácea para agente dispersor (figura 1), MeOH para solvente (Figura 2) e Na₂SO₄ para sal.

Por planejamento fatorial fracionado 2⁶⁻² foi avaliado a influencia de cada uma das etapas na extração dos analitos e a partir das variáveis independentes que demonstraram influencia nas respostas considerando p<0,1 e 90% de intervalo de confiança, foi realizado planejamento composto central rotacional para otimização do método.

Ainda assim, a continuidade deste estudo abrange a validação do método otimizado para análise de fármacos em tainha por MSPD observando as principais figuras de mérito (ANVISA, 2003; INMETRO 2010), avaliando ainda o efeito matriz na exatidão do método. Este demonstrado a sua aplicabilidade em amostras reais e comparado com outros métodos aceitos pela comunidade científica.

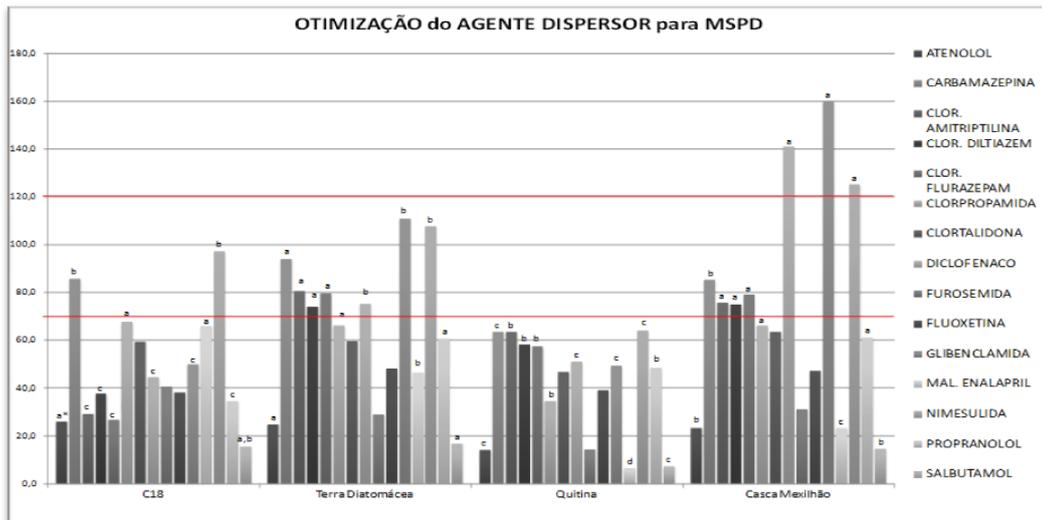


Figura 1. Otimização do agente dispersor para MSPD com demarcação em vermelho das concentrações aceitas como ótimas e letras iguais sem diferença estatística, segundo teste de Tukey

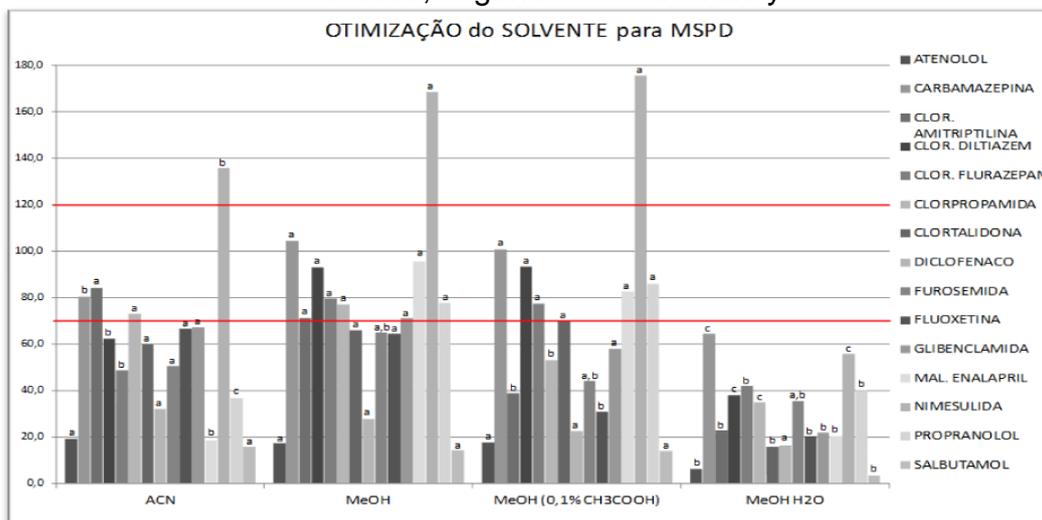


Figura 2. Otimização do solvente para MSPD com demarcação em vermelho das concentrações aceitas como ótimas e letras iguais sem diferença estatística, segundo teste de Tukey

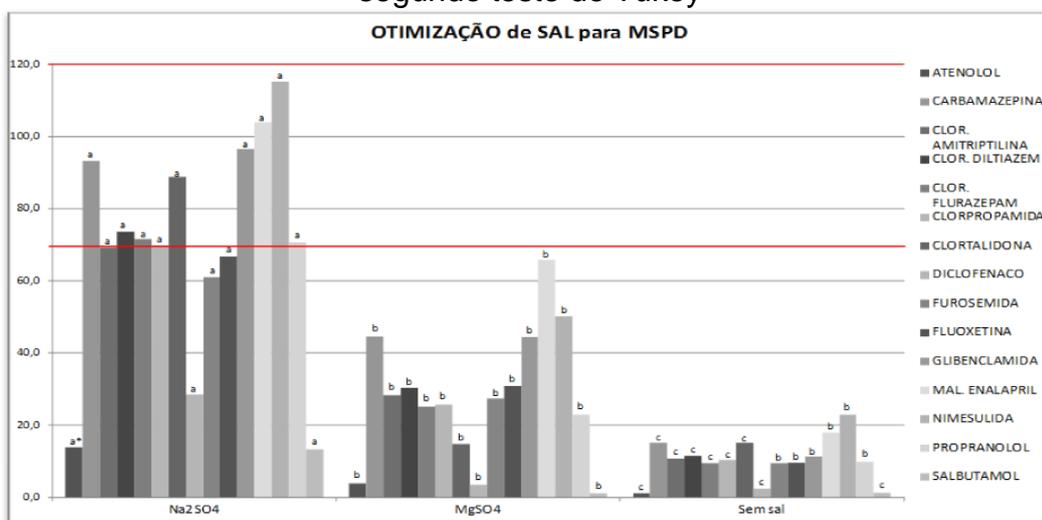


Figura 3. Otimização de sal para MSPD com demarcação em vermelho das concentrações aceitas como ótimas e letras iguais sem diferença estatística, segundo teste de Tukey

4. CONCLUSÕES

A MSPD demonstrou-se uma técnica que atende os parâmetros analíticos, uma técnica simples sem a necessidade de automação e com possibilidades de modificação, sendo uma técnica maleável e aplicável as necessidades atuais da química analítica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução (RE) nº 889, de 29/05/2003: **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Ministério da Saúde: Brasil 2003.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residue from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361, 1989.

CALDAS, S. S. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013.

DÓREA, J. G. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: Human health considerations. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1-3, p. 93-114, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2010.

SOARES, B. M. **Desenvolvimento de método para determinação de espécies de mercúrio empregando MSPD e GC-MS**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS.