



# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA PARA A DETERMINAÇÃO DE METFORMINA EM ÁGUA

*Andrea Sabag Duarte<sup>1</sup>, Natalia Dantas Rocha Ferre<sup>2</sup>, Emylaine Pereira dos Santos<sup>3</sup>, Jose Eduardo Goncalves<sup>4,5</sup>, Luciana Andreia Borin de Carvalho<sup>6</sup>*

<sup>1</sup>Especialista Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental, Campus Maringá-PR, Universidade Estadual de Maringá - UEM. andreasabag@hotmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC8/ICETI-UniCesumar. nataliaferre2004@gmail.com

<sup>3</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. emylainepereira4@gmail.com

<sup>4</sup>Orientador, Doutor do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas – PPGTL, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR.

<sup>5</sup>Pesquisador do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI, Maringá/PR. jose.goncalves@unicesumar.edu.br

<sup>6</sup>Co-Orientadora, Doutora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental e do Departamento de biotecnologia, genética e biologia celular, Campus Maringá-PR, Universidade Estadual de Maringá – UEM labcarvalho@uem.br

## RESUMO

Atualmente, a comunidade científica tem despertado considerável interesse no estudo de poluentes orgânicos, com foco nos produtos farmacêuticos, devido ao aumento no uso de medicamentos e às possíveis implicações ambientais relacionadas ao uso e seus descartes. Algumas características químicas dos fármacos, como a estabilidade, baixa biodegradabilidade, solubilidade em água e baixa adsorção podem contribuir para sua poluição e persistência nos ecossistemas aquáticos. A metformina usada para tratar diabetes tipo 2, pode ter efeitos adversos no ambiente, persistindo na água após tratamento. Esta pesquisa visa desenvolver um método analítico para quantificar metformina em amostras de água usando extração em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID). Amostras de água ultrapurificada serão contaminadas com concentrações conhecidas de metformina e processadas no Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas (LIABQ). Os resultados obtidos neste trabalho permitirão o desenvolvimento de metodologia analítica para análise de metformina em água doce e assim possibilitará avaliar a presença de resíduo deste fármaco em corpos hídricos. Além disso, o desenvolvimento deste tipo de metodologia analítica para a quantificação de metformina pode ser aplicado no monitoramento ambiental de resíduos de fármacos. Espera-se que o desenvolvimento da metodologia de extração e análise por GC-FID de metformina em água, possa contribuir com a caracterização deste desregulador endócrino no meio ambiente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Contaminação; Fármacos; Meio ambiente; Metodo analítico.

## 1 INTRODUÇÃO

No cenário atual, dentre as categorias de poluentes orgânicos, destaca-se de maneira proeminente a classe dos produtos farmacêuticos, capturando significativa atenção por parte da comunidade científica. Tal interesse advém do crescimento constante no uso de medicamentos e das implicações ambientais potenciais que essa classe de poluentes pode acarretar. Essa relevância tem sido enfatizada por pesquisadores renomados que buscam compreender os efeitos e as ramificações dessa crescente contaminação (BILA & DEZOTTI, 2003).

Um exemplar notável dentre essa categoria é a metformina (também conhecida como N,N-dimetilimidodicarbonimídica diamida), um derivado da biguanida. Este composto possui propriedades farmacológicas anti-hiperglicêmicas e é administrado oralmente, sendo uma escolha terapêutica de longa data no combate ao diabetes tipo 2. O mecanismo subjacente à ação da metformina reside na capacidade de inibir o processo de gliconeogênese no fígado, ao mesmo tempo em que estimula a absorção de glicose pelos músculos. Essa abordagem culmina em um aumento na sensibilidade do corpo à insulina, manifestando-se na redução dos níveis de glicose em jejum e da demanda por insulina em



indivíduos que lidam com a condição diabética (DOWLING et al., 2011; VIOLLET et al., 2012).

Pesquisas têm evidenciado que mesmo em concentrações mínimas, esses medicamentos podem ocasionar efeitos adversos no ambiente receptor, perdurando no abastecimento de água após o processo de tratamento (GAFFNEY et al., 2014; MONTAGNER, VIDAL & ACAYABA, 2017). A compreeção dos efeitos da metformina em uma ampla variedade de patologias demanda a exploração mais aprofundada dos mecanismos subjacentes que influenciam essas diferentes respostas (GUANGLI et al., 2021).

As características específicas dos fármacos favorecem sua persistência nos ecossistemas aquáticos, devido à sua alta estabilidade química, baixa taxa de biodegradabilidade, solubilidade elevada em água e baixos coeficientes de absorção/adsorção (GAFFNEY, 2014). O ambiente aquático, sendo o principal receptor de efluentes provenientes de atividades domésticas, industriais e agropecuárias, é também o principal veículo de dispersão para esses poluentes, seja através da descarga direta de esgoto não tratado ou tratado (GAFFNEY, 2014).

Assim, é importante reconhecer que a qualidade da água tratada resulta tanto das condições da fonte de captação quanto da eficácia do processo de purificação empregado (SIMAZAKI et al., 2015; MONTAGNER, VIDAL & ACAYABA, 2017). Adicionalmente, surge uma outra questão problemática: as instalações de tratamento de esgoto e água não foram originalmente concebidas com o propósito de eliminar de maneira específica as variadas categorias de poluentes que atualmente suscitam preocupação crescente. Isso pode conduzir à persistência desses elementos nos corpos d'água (GAFFNEY et al., 2014; LIMA et al., 2017).

Portanto, o propósito desta investigação consiste em elaborar uma abordagem analítica para a determinação quantitativa da metformina em amostras de água, utilizando o procedimento de extração em fase sólida combinado com a análise por cromatografia em fase gasosa e detecção por ionização em chama (GC-FID).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os padrões, solventes e reagentes utilizados no trabalho serão de grau HPLC. A água utilizada será ultra purificada através do sistema Sartorius Arium® mini. O padrão analítico de metformina utilizado no desenvolvimento experimental foi adquirido da Sigma-Aldrich.

A solução estoque de cada padrão de metformina será preparada na concentração de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  em solução metanólica. A solução estoque será armazenada em frasco de vidro âmbar e estocada em refrigerador a  $4^\circ\text{C}$ . À partir desta solução estoque serão preparadas as soluções de trabalho variando de  $100 - 4000 \text{ ng mL}^{-1}$ , sendo que estas serão diluídas também em solução metanólica para posterior análise por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) e construção da curva analítica.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica, 1 L de amostra de água ultrapurificada contendo concentrações controladas de metformina será extraído através do cartucho de extração em fase sólida SPE (SPE do inglês, Solid Phase Extraction) com fluxo de  $10 \text{ mL min}^{-1}$ . Após a adsorção da metformina na fase sólida, o cartucho será lavado com 10 mL de água deionizada, seguido de secagem do cartucho sob vácuo, por 20 min, para eliminar os traços de água e a eluição da metformina em concentração controlada será realizada com 3 mL de metanol grau HPLC. A alíquota final será concentrada por fluxo de



N<sub>2</sub> à secura e ressuspendido para um vial de 2 mL com metanol para, em seguida, ser submetida à derivatização.

Na reação de derivatização da metformina, 2 mL da amostra extraída e ressuspendida serão colocados em tubos de ensaio e evaporado à secura sob vácuo. O resíduo será derivatizado com 40 µL de MBTFA a 80 °C por 60 min. Finalmente, 2 mL de metanol (metanol) será adicionado, bem misturado e a solução de metanólica será transferida para um frasco âmbar (vial) de 2 mL para análise GC-FID.

As análises serão realizadas em um cromatógrafo a gás com detecção por ionização em chama (modelo Agilent 7890B) com injetor automático (CTC PAL Control) e equipado com coluna HP-5MS UI Agilent com fase de 5% de fenil metil siloxano (30,0 m x 250 µm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme). Para a separação adequada dos analitos no sistema GC-FID, será utilizada a temperatura do injetor de 280°C com a seguinte programação otimizada de temperatura do forno: temperatura inicial de 90°C mantida por 2 min, em seguida rampa de 10 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C e mantida por 2 min e finalizando com aquecimento de 50 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C. As demais condições do método de análise serão: volume de injeção de 2,0 µL no modo split 1:10, fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99999%) igual a 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O detector de FID será otimizado na temperatura de 300 °C com o fluxo de H<sub>2</sub> 30 mL min<sup>-1</sup>, Ar sintético com 300 mL min<sup>-1</sup> e N<sub>2</sub> como gás de fundo com 25 mL min<sup>-1</sup>. A aquisição e análise quantitativa dos dados serão realizados pelo software MassHunter a partir dos cromatogramas gerados na análise.

### 3 RESULTADOS ESPERADO E DISCUSSÕES

Este trabalho busca apresentar alternativas tecnológicas inovadoras para o desenvolvimento de metodologia analítica na detecção e quantificação de metformina em concentrações extremamente diluídas ecossistema aquático, através de um método de difícil extração e aplicação, visando facilitar a detecção precoce da poluição por resíduos farmacêuticos e sua extração em amostras de água. Espera-se também que a aplicação desta metodologia analítica quantitativa pode auxiliar no monitoramento ambiental e também ser capaz de prever a extensão da contaminação, justificando assim a realização de estudos do mapeamento da contaminação por resíduos farmacêuticos em águas de abastecimento público.

No meio ambiente, a presença de resíduos farmacêuticos, como a metformina, um desregulador endócrino, podem causar a degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, levando à ocorrência de desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação de lençóis freáticos e aquíferos.

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta desta pesquisa representa uma abordagem inovadora e multifacetada para lidar com a detecção de resíduos de fármacos em amostras ambientais, com potencial impacto nas áreas sociais, econômicas, ambientais e científicas. Através da integração de tecnologias inovadoras, desenvolvimento metodológico sólido e esforços para a formação de recursos humanos, espera-se não apenas contribuir para o avanço do conhecimento científico, mas também promover a conscientização pública, melhorar a qualidade ambiental e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de monitoramento e controle. O sucesso dessa pesquisa pode resultar em benefícios tangíveis para a sociedade, o meio ambiente e o progresso contínuo da ciência.



## REFERÊNCIAS

Bila, D. M., & Dezotti, M.. (2003). Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, 26(4), 523–530. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>. Acesso em: 07 ago. 2023

DOWLING, R.J., GOODWIN, P.J. & STAMBOLIC, V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. **BMC Med** 9, 33 (2011). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-33>. Acesso em: 07 ago. 2023

GAFFNEY, V. J.; ALMEIDA, C. M. M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; CARDOSO, V. V. ScienceDirect Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. **Water Research**, v. 72, p. 199-208, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.027> . Acesso em: 07 ago. 2023

LIMA, D. R. S.; TONUCCI, M. C.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S. F. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1.043-1.054, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522017165207>. Acesso em: 08 ago. 2023

LU, G.; WU, Z.; SHANG, J.; XIE, Z.; CHEN, C.; ZHANG, C. The effects of metformin on autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111286> . Acesso em: 08 ago. 2023.

SIMAZAKI, D.; KUBOTA, R.; SUZUKI, T.; AKIBA, M.; NISHIMURA, T.; KUNIKANE, S. Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health. **Water Research**, v. 76, p. 187-200, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.059>. Acesso em: 07 ago. 2023