

Otimização de um método extração para o antimicrobiano ciprofloxacino em cama de aviário

Optimization of an extraction method for the Ciprofloxacino antimicrobial in poultry litter

RESUMO

Letícia Maria Effting
leticiameffting@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.
Medianeira, Paraná, Brasil.

Ismael Laurindo Costa Junior
ismael@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR.
Medianeira, Paraná, Brasil.

Os poluentes emergentes têm despertado interesse decorrente das incertezas quanto aos possíveis efeitos de suas interações com determinadas matrizes ambientais. Os antibióticos têm se destacado pelo aumento da resistência microbiana que impacta diretamente a saúde humana. Neste estudo foi proposto o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação do antibiótico ciprofloxacina (CIP) em cama de aviário. Utilizando de um delineamento experimental simplex-centroide para a composição da fase extratora e para a otimização das etapas de extração foram aplicados um planejamento fatorial completo 2^3 e posterior delineamento composto central rotacional (DCCR), para adequação do volume de extrator, tempo de ultrassom e número de ciclos de extração. Os tratamentos sugeriram uma melhor recuperação do analito em torno do ácido acético e de suas misturas binárias. A condição otimizada indicou a composição de 53% ácido acético, 40% água e 7% acetonitrila como adequada para uma maior recuperação da ciprofloxacina. Quanto ao protocolo de extração o DCCR sugeriu valores ótimos quando aplicados 6 mL do extrator, com tempo de ultrassom de 11 min e 3 ciclos de extrações sucessivas. O ensaio de validação obteve recuperações médias de 110%. Os delineamentos experimentais foram promissores no fornecimento de condições adequadas para a extração da CIP.

PALAVRAS-CHAVE: Poluentes emergentes. Extração. Delineamentos experimentais.

ABSTRACT

Emerging pollutants have aroused interest due to uncertainties as to the possible effects of their interactions with certain environmental matrices. Antibiotics have been highlighted by the increase in microbial resistance that directly impacts human health. In this study we proposed the development of analytical methodology for the determination of the antibiotic ciprofloxacin (CIP) in poultry litter. Using a simplex-centroid experimental design for the composition of the extractions phase and for the optimization of the extraction stages, a complete factorial planning 2^3 and posterior central composite rotational design (DCCR) were applied to Adequacy of extractor volume, ultrasound time and number of extraction cycles. The treatments suggested a better recovery of the analyte around the acetic acid and its binary mixtures. The optimized condition indicated the composition of 53% acetic acid, 40% water and 7% acetonitrile as appropriate for a greater recovery of ciprofloxacin. As for the extraction protocol, the DCCR suggested optimal values when 6 mL of the extractor was applied, with an ultrasound time of 11 min and 3 cycles of successive extractions. The validation test obtained average recoverings of 110%. The experimental designs were promising to provide adequate conditions for the extraction of CIP.

KEYWORDS: Emerging pollutants. Extraction. Experimental designs.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A ciprofloxacina (CIP), é um antibiótico da classe das fluoroquinolonas (FQs), que apresenta características de amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo amplamente empregada na medicina humana e veterinária (TURIEL; MARTIN-ESTEBAN; TADEO, 2006). É considerada um poluente emergente que apresenta significativa estabilidade no meio ambiente. (JALIL; BASCHINI; SAPAG, 2015).

Na medicina veterinária, a CIP é administrada na produção de frangos de corte, sendo frequente durante o ciclo de produção das aves que estas sejam submetidas a diversas aplicações de fármacos (FIGUEIREDO, 2015) e, desta forma, é comum a eliminação de parte desses compostos na forma de metabólitos ou estruturas inalteradas pelas excretas das aves (USLU et al., 2008), constituindo parte da cama de aviário, que frequentemente é utilizada como fertilizante para solos cultiváveis. Assim, os resíduos dos fármacos presentes nessas amostras podem causar contaminação das matrizes ambientais e o aparecimento de microrganismos que apresentam resistência a esses medicamentos.

O interesse crescente por essas substâncias ocorre, principalmente, porque elas podem apresentar atividade biológica em concentrações muito baixas. A presença de determinados fármacos mesmo que em concentrações da faixa de nanogramas por litro (ng L^{-1}) a microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$), podem gerar efeitos tóxicos no ecossistema (MELO et al., 2009). Portanto, conhecer os impactos ambientais dos resíduos de fármacos tornou-se motivo de grande interesse. Assim, propõe-se avaliar o efeito de solventes orgânicos empregados na etapa de extração, empregando DCCR para ácido acético, água e acetonitrila, para extrair CIP da cama de aviário, além de otimizar as condições de extração do fármaco em termos das variáveis: volume de solvente extrator, número de extrações e tempo de ultrassom, empregando Planejamento fatorial completo 2^3 e posterior DCCR para os tratamentos.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do protocolo de extração e realização dos ensaios foram empregadas alíquotas de cama coletadas em aviários da região oeste paranaense. No laboratório, as amostras foram secas em estufa à 80°C por 24h e peneiradas em malha de $53\ \mu\text{m}$, para melhor homogeneidade. Posteriormente, estocadas em frascos fechados e mantidos sob refrigeração em congelador. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: Ácido acético (NEON), acetonitrila (J.T.BAKER), água ultrapura (Milli-Q). O padrão de ciprofloxacina (Sigma-Aldrich), adquirido foi de grau HPLC com pureza superior a 98,0 %. Foram preparados 100 mL de uma solução estoque de 1000 mg/L de ciprofloxacina. Esta foi usada para todas as aplicações necessárias nos ensaios.

No protocolo de extração, duplicatas de cada matriz, secas e peneiradas, passaram por micro extração, auxiliada pelo ultrassom. Aproximadamente 0,5 g de amostra de cama de aviário foram inseridas em tubos falcon e fortificadas com 500 μL da solução estoque de ciprofloxacina 1000 mg/L. Após 24 h, acrescentou-se a quantidade de solvente de acordo com o delineamento experimental em cada estudo. A homogeneização da mistura ocorreu por agitação em vortex durante 30

s. Na sequência, as amostras foram levadas ao ultrassom, por 15 min. Para a separação das fases foi empregada centrifugação por 15 min a 2000 rpm. O extrato foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL, e a amostra resubmetida ou não aos mesmos procedimentos conforme o planejamento experimental empregado. O extrato final foi avolumado em água ultrapura e filtrado em filtro de seringa 0,22 μm (nylon, Chromafil®).

Para a quantificação do analito nos extratos obtidos foi realizada a medida de absorbância através do espectrofotômetro Uv-Vis, de varredura com feixe duplo, marca PerkinElmer, modelo Lambda 45, em $\lambda = 278$ nm. O protocolo de extração também foi efetuado com alíquotas de cama de aviário sem fortificação de ciprofloxacina, para a obtenção de resultados comparativos.

Para o estudo da influência da composição do solvente extrator na porcentagem de recuperação do analito foi realizado um planejamento de misturas simplex-centroide. Foram testadas $2^n - 1$ combinações, sendo n o número de componentes ou variáveis cuja soma é 1 ou 100%, para 3 componentes com duas repetições, totalizando 20 ensaios, (BARROS NETO, SCARMINIO E BRUNS, 2003; MOREIRA *et al.*, 2014). No estudo foi investigada a eficiência de extração de 5 mL dos solventes: ácido acético, acetonitrila e água ultrapura e suas misturas segundo o planejamento delineado. Uma segunda otimização, visando adequar o protocolo de extração quanto ao menor emprego de solventes, cujas proporções foram definidas separadamente, o tempo de processamento e o número de extrações, foi avaliada por meio da aplicação de um planejamento experimental do tipo DCCR. Este foi composto pelo planejamento fatorial completo 2^3 (22 ensaios), com adição de 6 pontos axiais (12 ensaios) totalizando 34 ensaios.

O programa computacional Statistica 10.0 foi utilizado para ajuste dos dados experimentais aos modelos linear e quadrático, assim como a obtenção de curvas de níveis e a otimização. A validação do modelo mais adequado foi realizada com base na ANOVA das regressões e verificação da falta de ajuste, a otimização foi realizada pela análise da superfície de resposta obtida com identificação das condições ótimas para a extração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação da melhor composição de solvente extrator e a otimização das etapas do protocolo de extração para recuperação do analito a partir da cama de aviário, foi realizada em ensaios de adição e recuperação dos padrões, com o auxílio dos planejamentos simplex-centroide e DCCR 2^3 . Considerando o emprego dos solventes ácido acético, acetonitrila e água na extração em cama de aviário, pode ser verificada uma recuperação superior a 50% para o analito em todos os ensaios, exceto para o ensaio onde foi utilizado apenas água. O ensaio onde foi testada uma mistura binária de ácido acético e água apresentou a maior recuperação do analito.

Empregando o DCCR 2^3 para avaliação dos efeitos de tempo de ultrassom, número de extrações e volume sobre e recuperações de CIP, foram verificadas recuperações superiores a 90% para a maioria dos ensaios, sendo que a condição onde se utilizaram 5 mL de solvente extrator, 10 minutos de ultrassom e 3,68 ciclos

de extrações apresentou o maior percentual de recuperação do analito, superior à 160%.

A avaliação do efeito do solvente na extração do analito da matriz para a interpretação dos resultados obtidos, ocorreu pelo ajuste dos dados a modelos de mistura linear, quadrático e cúbico especial, considerando o planejamento simplex-centroide. A definição do modelo mais adequado ocorreu pela ANOVA de regressão e pelo teste de falta de ajuste ao nível de confiança de 95%. A Tabela 1 apresenta a análise de variância para a modelagem do efeito solvente na matriz.

Tabela 1 – Análise de variância (ANOVA) para comparação dos modelos linear, quadrático e cúbico no o estudo do efeito da mistura de solventes sobre as recuperações de CIP em cama de aviário.

| Modelo | GL regressão | GL resíduos | p-Valor | F calculado | R ² |
|------------|--------------|-------------|---------|-------------|----------------|
| Linear | 2 | 17 | 0,018 | 5,14 | 37,70 |
| Quadrático | 3 | 14 | 0,000 | 23,34 | 89,62 |
| Cúbico | 2 | 11 | 0,004 | 9,62 | 96,26 |

SQ=Soma quadrática; GL= Graus de liberdade; MQ= Média Quadrática.

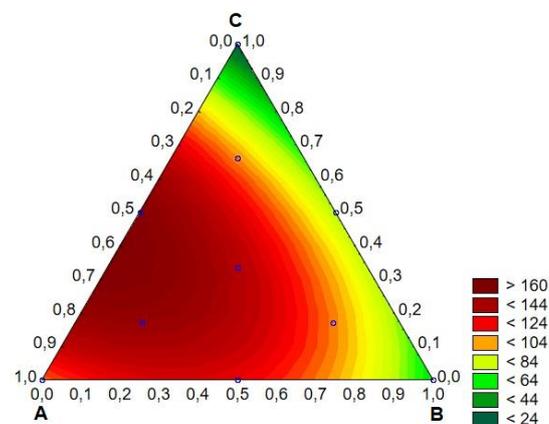
F_{crítico} (0,05; 2,17) =3,59; F_{crítico} (0,05; 3,14) =3,34 e F_{crítico} (0,05; 2,11) =3,98

Fonte: Autoria própria, (2019).

O modelo linear foi rejeitado, pois apesar da regressão ter sido significativa com base no $F_{calculado}$ e p -Valor, apresentou valor de coeficiente de determinação (R^2) inferior a 38% para a ciprofloxacina. A análise de variância também indicou regressão significativa para o modelos quadrático e cúbico (p -Valor<0,05 e $F_{crítico}$ < $F_{calculado}$), porém o modelo cúbico especial apresentou melhor coeficiente de determinação (R^2). Desse modo, a avaliação do efeito solvente sobre as recuperações, considerou o modelo cúbico especial, sendo que o estudo da falta de ajuste comprovou que o modelo cúbico especial se ajusta satisfatoriamente aos dados experimentais.

O gráfico de contorno, representado na Figura 1, gerado pelo modelo cúbico especial, reproduz os efeitos das interações entre os solventes e suas misturas.

Figura 1- Gráfico de contorno para os efeitos da mistura de solventes sobre as recuperações de CIP previstas pelo modelo cúbico em cama de aviário.



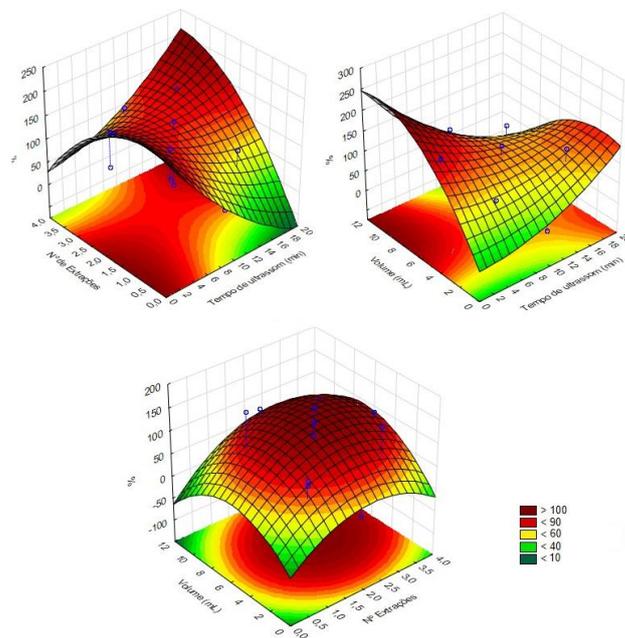
(A) Ácido acético; (B) Acetonitrila e (C) Água.

Fonte: Autoria própria, (2019).

Na Figura 1, o gráfico de contorno permite observar as regiões de maior recuperação do analito em torno do ácido acético e de suas misturas binárias. A condição otimizada indicou a composição de 53% ácido acético, 40% água e 7% acetona nitrila como adequada para uma maior recuperação da ciprofloxacina.

A avaliação do efeito das variáveis tempo de ultrassom, volume de solvente e número de extrações foi realizada com o auxílio do delineamento experimental DCCR 2³ com a finalidade de estabelecer uma condição ótima para extração do analito após definidas as proporções ideais na mistura de solventes. As superfícies de resposta apresentadas na Figura 2, permitem uma análise visual dos efeitos sobre os percentuais de recuperação.

Figura 2 – Superfícies de resposta para os efeitos das variáveis tempo de ultrassom, número de extrações e volume de acordo como modelo quadrático do DCCR 2³ sobre as recuperações de CIP em cama de aviário.



Fonte: Autoria própria, (2019).

As variáveis do número de extrações e volume de solvente, apresentaram o comportamento proporcional, sendo que quanto maiores, melhores são as recuperações, sendo que a região com maior recuperação do analito situa-se em torno do ponto central. Quanto ao protocolo de extração o DCCR sugeriu valores ótimos quando aplicados 6 mL do extrator, com tempo de ultrassom de 11 min e 3 ciclos de extrações sucessivas. O ensaio de validação obteve recuperações médias de 110%.

CONCLUSÃO

Referente a avaliação do efeito de solventes orgânicos empregados na etapa de extração, o planejamento de misturas simplex-centroide mostrou-se adequado no estudo do efeito da proporção entre os solventes ácido acético, acetona nitrila e água na composição da fase extratora, pois o modelo cúbico especial foi significativo ao nível de confiança de 95% para o analito. Quanto a otimização das

condições de extração do fármaco em termos das variáveis, o DCCR 2³ para estudo do tempo de ultrassom, volume de solvente e número de extrações forneceu, dentro dos níveis estudados, a melhor opção nos valores de recuperação ao nível de significância de 95%, para a recuperação da CIP em cama de aviário.

REFERÊNCIAS

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. Porto Alegre: Editora da UNICAMP, 2003. 420.

FIGUEIREDO, L. A. **Fluoroquinolonas na avicultura: impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos**. 2015. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. doi:10.11606/T.64.2015.tde-26062015-095445. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-26062015-095445/pt-br.php>. Acesso em: 26 de julho, 2019.

JALIL, M. E. R.; BASCHINI, M.; SAPAG, K. Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 69-76, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131715001787>. Acesso em: 27 de julho, 2019.

MELO, S. A. S. et al. Degradation of residual pharmaceuticals by advanced oxidation processes. **Química Nova**, Araraquara -SP, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422009000100034&script=sci-abstract>. Acesso em: 27 de julho, 2019.

MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em Coffea arabica. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 39-43, 2014.

TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta**, v.562, n. 1, p. 30-35, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006001978>. Acesso em: 26 de julho, 2019.

USLU, M. Ö., et al. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, v.190, p.55-63, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-007-9580-0>. Acesso em: 27 de julho, 2019;

AGRADECIMENTOS

À UTFPR - Campus Medianeira pelas condições e estrutura oportunizado, tanto quanto ao meu orientador Prof^o Dr^o Ismael L. Costa Jr. pela oportunidade e auxílio no desenvolvimento deste projeto. À UTFPR - Campus Pato Branco pela promoção do evento XXIV SICITE.