

## Determinação de antibióticos em águas

# Desenvolvimento de novas metodologias para determinação de antibióticos em águas de consumo [estudo exploratório]

Bruno M.C. Godinho<sup>1</sup>, João Mário Pedro<sup>2</sup>, Anabela Graça<sup>2</sup>

1. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. bmcruzgod@gmail.com

2. Área Científica de Farmácia, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa.

**RESUMO:** Está hoje bem estabelecido que os antibióticos são constantemente libertados e introduzidos no meio ambiente em consequência da sua extensa utilização na medicina humana e veterinária. A presença destes compostos tem vindo a ser verificada, por diversos autores, em águas subterrâneas, águas de superfície e águas residuais. O impacto que deriva da acumulação destas substâncias a nível ambiental, nomeadamente, situações de toxicidade e/ou desenvolvimento de resistências bacterianas, impõe um controlo sobre a qualidade das águas no que respeita a estas substâncias. Este estudo pretende explorar a aplicabilidade da extracção por fase sólida (SPE) utilizando resinas de fase reversa C-18, para a determinação de tetraciclina (TC), cloranfenicol (CPA) e estreptomicina (STP) em amostras de água padronizadas. A separação cromatográfica foi elevada a cabo por cromatografia líquida de alta pressão com detector de fotodiodos (HPLC-DAD) empregando uma coluna C18 de fase reversa (30cm x 3.9mm, 5µm de tamanho partícula). A monitorização dos antibióticos foi realizada por um varrimento de comprimentos de onda específicos para cada um dos compostos (357, 277, e 257nm para TC, CPA e STP, respectivamente). O solvente de eluição constituiu um factor determinante na extracção dos antibióticos da resina utilizada, tendo sido conseguidas extracções máximas de 77,1% para a TC e de 15,3% para o CPA; não foi conseguida qualquer recuperação para a STP com a resina utilizada. Assim, o método revelou-se eficaz para a análise conjunta dos antibióticos CPA e TC, recomendando-se a análise da STP por um método separado, dada as suas elevadas características polares.

*Palavras-chave:* tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, análise de águas, SPE, HPLC-DAD.

## Exploratory Study for the development of new methodologies for antibiotics determination in water samples

**ABSTRACT:** It is nowadays well established that antibiotics are constantly released to the environment as a consequence of their broad use in human and animal therapy. The presence of these substances in superficial, underground and residual waters, have being detected by several authors. Resistant bacterial strains and toxicity risks are the major concerning impact for the environment which demands a quality control of the waters. Thus, the development of new methodologies for environmental antibiotic determination is an important issue. The suitability of a Solid Phase extraction technique using a C-18 reversed phase packed material and several elution solvents were tested for detection of Tetracycline (TC), Chloramphenicol (CPA) and Streptomycin (STP) in standard water samples. The chromatographic separation was held in High Pressure Liquid Chromatography equipment with a diode array detector, using a C-18 reversed phase column (30cm x 3.9mm d.i., 5µm particle size). The specific absorption wavelenght for each antibiotic was monitored: 357, 277, and 257nm for TC, CPA and STP. The elution solvent was determinant for the extraction step, as we achieve 77,1% of recovery for TC and 15,3% for CPA; no recovery was achieved for STP. Therefore, a method of analysis for the TC and CPA was established, however a separated method of analysis is suggested for the analysis of STP, due to its high polar behavior.

*Keywords:* tetracycline, chloramphenicol, streptomycine, water analysis, SPE, HPLC-DAD.

## Introdução

Os antibióticos assumem especial significância pelo facto de constituírem ferramentas terapêuticas úteis no combate e profilaxia de infecções tanto no ser humano, como no animal<sup>1</sup>; e ainda, pelo facto de serem utilizados conjuntamente com promotores de crescimento na pecuária<sup>2</sup>.

A absorção dos antibióticos pelo organismo humano e animal é, regra geral, fraca, sendo 25–75% destas substâncias excretadas na forma inalterada, através das fezes e da urina<sup>3</sup>. As drogas utilizadas em terapia são frequentemente introduzidas no meio ambiente pela sua libertação, indevida, das redes de saneamento básico (esgotos), afectando sobretudo águas de superfície<sup>4</sup>; por outro lado, o uso de antibióticos na prática veterinária contribui para a introdução destes compostos no meio ambiente pela utilização de estrumes para a fertilização de campos de agricultura, promovendo a sua acumulação nos solos e posterior arrastamento para águas subterrâneas e superficiais. No caso da piscicultura, a utilização de antibióticos permite a entrada directa destas substâncias no compartimento aquático, podendo-se atingir elevadas concentrações locais<sup>5</sup>. A contínua libertação de antibióticos, embora em níveis muito reduzidos (partes por bilião (ppb) ou sub-ppb), pode a longo termo conduzir ao aumento das suas concentrações no meio ambiente, podendo-se traduzir em situações de toxicidade<sup>6</sup>; ou ainda, no aparecimento de resistências bacterianas.

A técnica mais utilizada para a extracção destes compostos das amostras de água é a extracção por fase sólida (*Oa*, SPE), através de cartuchos *Oasis HLB* ou *MCX*<sup>5-11</sup>. Outras fases estacionárias para extracção por fase sólida, tais como: *Oasis SAX*, *SDB 1*, *Isolut ENV+* ou cartuchos *C18*, tem sido também propostos por alguns outros autores<sup>4,12-14</sup>. A análise dos antibióticos é usualmente realizada por cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC), sendo a sua detecção realizada por espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*, MS). Este método é uma ferramenta poderosa para a determinação de concentrações de antibióticos muito baixas em amostras de água colhidas no meio ambiente<sup>5-9,11-12</sup>. Contudo, o custo elevado associado a esta técnica restringe o número de laboratórios que a podem utilizar, facto pelo qual, o uso de detectores UV-vis ou de detectores compostos por conjunto de diodos e sistemas de transferência de carga (*Diode Array Detectors*, DAD) tem sido propostos por outros autores, apesar da sensibilidade destas técnicas ser mais limitada<sup>7,14</sup>.

Com o desenvolvimento deste trabalho pretendeu-se desenvolver um método baseado em SPE-HPLC-DAD para a detecção e determinação de Tetraciclina (TC), Cloranfenicol (CPA) e Estreptomicina (STP) em amostras de água padronizada, tornando a técnica de detecção de antibióticos em meio aquoso mais rápida e económica para laboratórios de rotina.

## Materiais e Métodos

### Reagentes e soluções

O padrão de cloranfenicol *Vetranal*<sup>®</sup> [CAS No 56-75-7] foi

obtido na Riedel-de-Haën. O padrão de tetraciclina [CAS No 60-54-8] (98%) e a solução padrão de estreptomicina (1mg/ml, em água, 1mM de Na<sub>2</sub>EDTA) foram obtidos na Fluka. Foram preparadas soluções individuais *Stock*, em metanol PESTANAL<sup>®</sup>, obtendo-se no final soluções com 1mg/ml(ca.). A partir de cada uma destas soluções individuais *Stock*, foi preparada uma solução padrão MIX de 100ppm, em metanol PESTANAL<sup>®</sup>. Partindo desta última, preparou-se uma solução padrão MIX de 20ppm em metanol, a injectar no HPLC para posterior cálculo da eficiência de extracção. Todas as soluções padrão foram guardadas em frascos de vidro escuro e armazenadas a -20°C.

Para desenvolver e otimizar a técnica de SPE, amostras de água padrão (500mL), foram enriquecidas com os antibióticos em estudo a 0,4ppm. As amostras de água padrão foram preparadas em água ultrapura (Millipore 18,2MΩcm), pré-tratadas mediante a adição de Na<sub>2</sub>EDTA (2g/L), e deixadas estabilizar durante 24h antes de realizar o processo de extracção, salvo determinadas excepções.

Metanol PESTANAL<sup>®</sup> (MeOH) e ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic Acid*, TFA) foram obtidos na Riedel-de-Haën; acetonitrilo (ACN) CHROMASOLV<sup>®</sup> na Sigma; ácido oxálico na BDH; acetato de amónio na Pronolab; ácido pentafluoropropanoico (*pentafluoropropanoic acid*, PFPA), ácido heptafluorobutírico (*heptafluorobutiric acid*, HFBA), ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (Na<sub>2</sub>EDTA) e ácido bórico, na Fluka; todos estes reagentes foram utilizados para adequação das condições cromatográficas à análise a realizar.

### Equipamento de HPLC-DAD

Foi utilizado um sistema HPLC da Waters<sup>®</sup> [*Controller and Pump 900* e *Photo Diode Array Waters 600*], equipado com *software* Millenium V.3.2. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna de fase reversa à base de octadecilsiloxano, *μBondapak C18* da Waters<sup>®</sup> (30cmx3.9mm, e 5μm de tamanho de partícula).

A análise por HPLC da TC e do CPA foi conseguida usando ACN (A)/Ácido Oxálico (10mM) com TFA (0,05%) (B) como fase móvel. Os dois compostos foram eluídos da coluna a um fluxo constante de 1mL/min com o gradiente para a fase móvel de: t=0 min, A:B (30:70); t=3 min, A:B (30:70); t=20 min, A:B (90:10); t=22 min, A:B (90:10); t=23 min, A:B (30:70); t=30 min, A:B (30:70). A detecção dos compostos foi monitorizada entre os comprimentos de onda 195 e 400 nm, sendo a quantificação feita a 357nm e 277nm para a TC e CPA, respectivamente.

A análise cromatográfica da STP foi feita com uma eluição isocrática utilizando ACN/acetato de amónio (3.2mM) com PFPA (1.9mM), a um fluxo constante de 0.5mL/min. A quantificação deste composto foi feita a 257nm.

### Equipamento e material SPE

Colunas de vidro e cartuchos de plástico da SUPELCO<sup>®</sup> foram recheados com 255mg de Resina C-18 (SUPELCO<sup>®</sup>), previamente pesada, e dois microfiltros da SUPELCO<sup>®</sup> aplicados nas extremidades. A passagem dos solventes de

acondicionamento e eluição, como também a amostra de água padrão, foi realizada a um fluxo de 4mL/min, utilizando: uma bomba peristáltica da ISMATEC® no caso da coluna; uma seringa esterilizada, no caso do cartucho.

Amostras de água padrão (500mL) foram enriquecidas com os antibióticos em estudo a 0,4ppm. Estas amostras foram passadas através da resina, após acondicionamento da mesma (20mL de MeOH+10mL de HCl 0,5 N+10mL de Na<sub>2</sub>EDTA (2g/L)). A resina foi lavada utilizando 15mL de água ultrapura, e procedendo-se seguidamente à sua secagem durante 15 minutos, utilizando ar comprimido. A eluição dos antibióticos foi realizada com 10mL da mistura (50:50) MeOH/acetato de amónio 3.2mM+PFPA 1.9mM. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.

## Resultados e Discussão

Um passo fundamental para o controlo de qualidade da água é o desenvolvimento de um método que permita a múltipla análise de antibióticos em amostras de água, de uma forma simples, rápida e económica. Diversos autores, têm referido as técnicas de SPE (técnica preparativa) e de HPLC-DAD (técnica analítica) como poderosas ferramentas para esse objectivo<sup>15-18</sup>. Para desenvolvimento do método estudaram-se diferentes parâmetros da técnica, controláveis pelo investigador, sendo a variação na eficiência de extracção registada. Os parâmetros manipulados foram: (i) solvente de eluição dos compostos, (ii) condições de activação da resina, (iii) tipo de empacotamento da resina, e (iv) tratamento prévio da amostra de água.

### Condições cromatográficas de separação dos antibióticos

Foram realizados diversos ensaios com vários solventes orgânicos e aquosos, utilizando tanto o modo isocrático de eluição, em diferentes percentagens, como também, a eluição por gradiente.

As condições cromatográficas que permitem uma análise mais favorável do CPA implicam a utilização de um modo de eluição em gradiente linear utilizando ACN, como fase orgânica, e uma solução de acetato de amónio 10mM com 0,05% de TFA, como fase aquosa, a um fluxo constante de 1ml/min. Nessas condições cromatográficas é possível observar aos 7,6 minutos um pico cromatográfico correspondente ao CPA (pico máx. de abs. aos 277nm).

A utilização de ACN, como fase orgânica, e uma solução de ácido oxálico 10mM com 0,05% de TFA, como fase aquosa, num modo de eluição em gradiente linear; revelaram-se como condições propícias para a separação da TC. Verificou-se que, com a adição de ácido oxálico à fase aquosa, as assimetrias dos picos cromatográficos foram reduzidas e a resolução cromatográfica melhorada. Oka e colaboradores<sup>16</sup> obtiveram resultados condizentes utilizando cromatografia em camada fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) e técnicas de HPLC; considerando que a adição de ácido oxálico na fase móvel é essencial para o controlo da instabilidade química das tetraciclinas.

**Tabela 1:** Melhores condições cromatográficas de análise para os antibióticos em estudo.

Antibiótico	Fase Móvel	Fluxo (ml/min)	$\lambda$ (nm)
Cloranfenicol	ACN / Ác. Oxálico 10mM com 0,05% TFA	1	277
Tetraciclina	ACN / Ác. Oxálico 10mM com 0,05% TFA	1	357
Estreptomicina	ACN / Acetato de amónio 3.2mM com PFPA 1.9mM	0,5	257

**Tabela 2:** Solventes de eluição dos antibióticos.

Extracção por fase sólida	
Percentagem (%)	Solventes
(100)	Metanol
(75:25)	MeOH/Ácido Oxálico 10mM + TFA (0,05%)
(50:50)	MeOH/Ácido Oxálico 10mM + TFA (0,05%)
(25:75)	MeOH/Ácido Oxálico 10mM + TFA (0,05%)
(100)	Ácido Oxálico 10mM + TFA (0,05%)
(50:50)	MeOH/Água
(50:50)	MeOH/Acetato de Amónio 3.2mM + PFPA 1.9mM

A utilização de colunas à base de copolímeros de poliestireno-divinilbenzeno tem sido propostas, porém estas requerem um longo tempo de espera para a separação da TC<sup>16, 19</sup>.

Nas condições acima apresentadas a TC apresentou um pico cromatográfico aos 4,5 minutos, com três máximos de absorção, nomeadamente, aos 220, 266 e 357 nm. Nas condições cromatográficas utilizadas para a análise da TC, é possível obter, para o CPA, um pico cromatograficamente aceitável nos 277nm, aos 7,0 minutos.

Relativamente à STP, a análise deste composto revelou ser mais satisfatória aquando a utilização de um fluxo inferior, 0,5mL/min, e quando foi utilizado o modo isocrático, com as seguintes proporções entre solventes: 15% de ACN e 85% de solução de acetato de amónio 3.2mM com PFPA 1.9mM. O PFPA conduz à obtenção de picos bem definidos, resultados também evidenciados por outros autores<sup>20</sup>. Heller e colaboradores<sup>21</sup>, referem ainda que a adição de ácido heptafluorobutírico (HFBA, *heptafluorobutiric acid*) possibilita uma melhor resolução dos picos cromatográficos para a STP. Contudo, ensaios realizados por Bogially e colaboradores<sup>22</sup>, revelaram que a utilização de HFBA (> 10mM) poderá levar a diminuição do tempo útil de vida da coluna e da sua performance, uma vez que provoca a hidrólise gradual dos grupos químicos da fase estacionária; por esta razão, a sua utilização neste estudo foi evitada.

Nas condições acima descritas para a análise da STP, obteve-se um pico cromatográfico aos 4,6 minutos, com um pico de absorção máximo aos 257nm, que sai mesmo antes da frente do solvente. Este facto demonstra a escassa

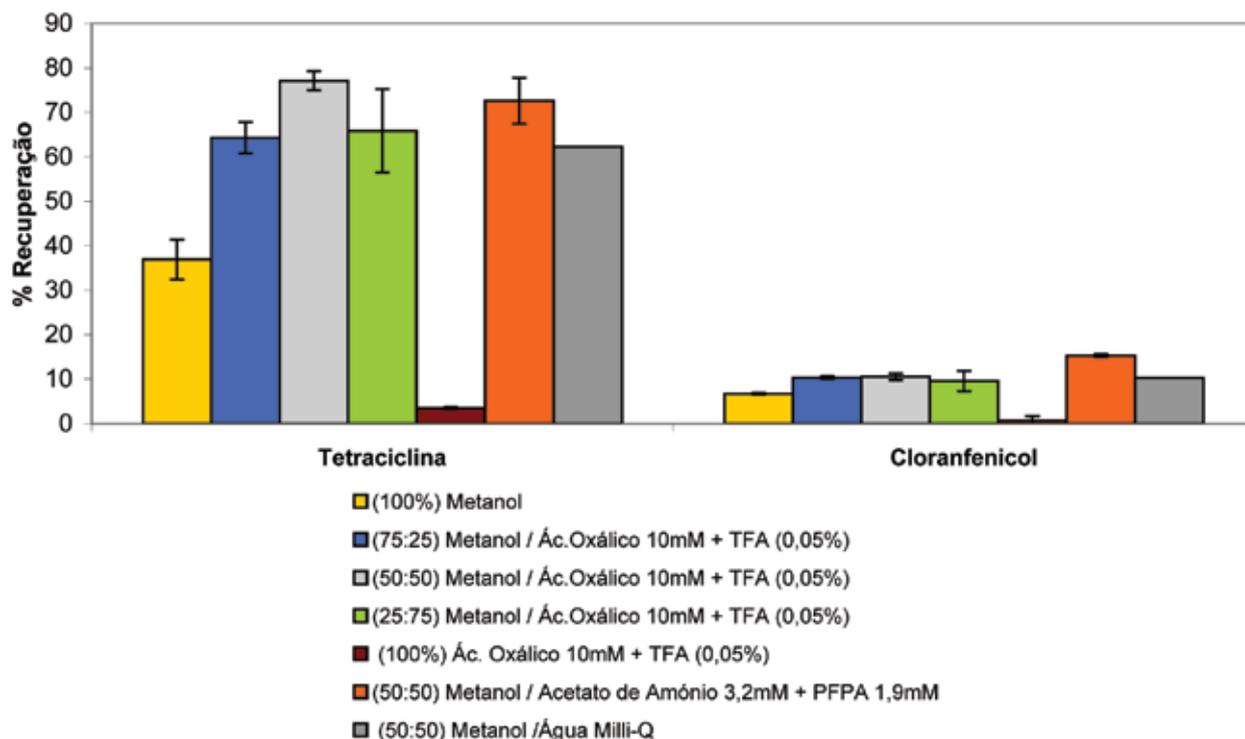


Figura 1: Gráfico da recuperação dos antibióticos TC e CPA, da resina de extração por fase sólida (C18), obtida para os diferentes solventes de eluição estudados. Acondicionamento da coluna realizado com 10 ml MeOH; 5 ml HCl 0,5N; 5 ml Na<sub>2</sub>EDTA (2g/L). Lavagem e eluição dos contaminantes utilizando 15 ml de Água ultrapura. Secagem da resina de extração durante 15 minutos utilizando ar comprimido. Extração dos antibióticos feita com 10ml de determinado solvente ou mistura de solventes (n = 2 ensaios para cada uma das proporções, excepto para a mistura 50:50 MeOH e Acetato de Amônio 3,2mM + PFFA).

capacidade de retenção da coluna cromatográfica (C18), que sendo muito lipofílica, não consegue reter a STP devido às suas características hidrofílicas. Por outro lado, Bovanová e Brandsteterová<sup>15</sup> referem a eficiente separação da estreptomomicina e de outros compostos farmacêuticos de elevada polaridade utilizando colunas de fase reversa C8<sup>15</sup>.

A análise da STP foi apenas conseguida com as condições cromatográficas acima referidas, pelo que a análise conjunta dos 3 antibióticos ficou comprometida, conseguindo-se apenas a análise conjunta do CPA e da TC (sendo a análise da STP realizada à parte).

Na tabela resumo (Tabela 1) estão enunciados as melhores condições cromatográficas (fase móvel, fluxo e comprimento de onda) obtidas para cada um dos antibióticos, e que serão utilizadas para a análise das amostras padronizadas obtidas por SPE.

### Condições de extração e pré-concentração dos antibióticos

#### (i) Solvente de eluição dos compostos

Após o acondicionamento (10mL MeOH; 5mL HCl 0,5N; 5mL Na<sub>2</sub>EDTA), foi carregada a amostra na resina, e seguidamente feita a eluição com 10mL de determinado solvente ou mistura de solventes (Tabela 2). Para cada solvente de eluição ou mistura de solventes foi realizado n=2 ensaios.

O gráfico (Figura 1) revela que a utilização de proporções crescentes da solução de ácido oxálico 10mM com 0,05% de TFA, possibilita a extração de maior quantidade de TC, sendo a recuperação máxima conseguida de 77,1%, quando é utilizada uma mistura de 50:50 com MeOH. A acidificação do meio provocada pelo ácido oxálico e TFA estabiliza a estrutura química da TC, como já foi referido por Oka e colaboradores<sup>16</sup>, o que provavelmente leva ao aumento na sua recuperação. Porém, o aumento substancial da polaridade da mistura de solventes utilizada, proporções superiores a 25:75 MeOH/ác. oxálico com TFA, demonstrou um decréscimo abrupto na recuperação da TC. Situação que pode ser explicada pela ligação da TC aos grupos silanol da resina de extração e na incapacidade da mistura de solventes de provocar a sua extração da resina. Uma eficiente recuperação da TC da resina de extração está então dependente da utilização de uma proporção adequada de solvente orgânico e aquoso (contendo ácido oxálico)<sup>16,23</sup>.

Apesar de menos evidente, o CPA regista um comportamento similar ao da TC, atingindo uma eficiência de extração máxima de 10,5%, com a utilização destes solventes de eluição. A utilização de uma mistura de MeOH/água *milli-Q* (50:50) como solvente de eluição permitiu obter uma recuperação de 62,3% para a TC e de 10,3% para o CPA. A eficiência de extração máxima para o CPA,

em todos os ensaios realizados foi de 15,3%, valor atingido mediante a utilização de uma mistura de MeOH/Acetato de Amônio 3,2mM com PFPA 1,9mM (50:50), para a eluição da amostra de antibióticos da resina. A utilização da mistura anteriormente referida revelou-se, também, muito vantajosa para a extracção da TC permitindo uma recuperação de 72,6%.

O cromatograma do padrão contendo 20 ppm de TC e de CPA analisado nas condições ideais para a separação cromatográfica da TC, referidas anteriormente, encontra-se representado na Figura 2a. Na Figura 2b, revela-se um cromatograma obtido nas mesmas condições cromatográficas do padrão, tratando-se de uma amostra de SPE em que se acondicionou a coluna com 10mL MeOH; 5mL HCl 0,5N; 5mL Na<sub>2</sub>EDTA, utilizando MeOH a 100% como solvente de eluição. Repare-se que comparativamente ao cromatograma do padrão Figura 2a, a intensidade dos picos cromatográficos é inferior.

Em nenhum dos ensaios de extracção foi possível recuperar a STP. Esta dificuldade reside, provavelmente, na elevada polaridade desta substância que não permite a sua retenção na resina C18 utilizada. O ajuste do pH da amostra para 4, utilizando ácido fosfórico, revelou resultados satisfatórios em estudos realizados por Huang e colaboradores<sup>24</sup>. Por outro lado, a utilização de resinas SCX (resina de troca iónica) encontra-se descrita na literatura como ferramenta útil para extrair substâncias com um comportamento polar catiónico, como é o caso da STP e outros aminoglicosídeos<sup>25</sup>.

#### (ii) Condições de activação da resina

A importância do acondicionamento e activação da resina foi testada mediante a extracção das amostras de água padronizada, após diferentes protocolos de acondicionamento, sendo no final a eluição dos compostos feita com MeOH 100%. Protocolos de acondicionamento com reduzidos volumes evidenciaram taxas de recuperação inferiores aos protocolos que utilizavam volumes maiores. Assim, a utilização de acondicionamentos com 20ml de MeOH+10mL de HCl 0,5 N+10mL de Na<sub>2</sub>EDTA (2g/L) permitiram um aumento na eficiência de extracção, de 5,6% para a TC (atingindo os 42,5%) e de 0,4% para o CPA (atingindo os 7,1%) comparativamente aos ensaios realizados anteriormente (Figura 3). A explicação pode residir no facto de que um maior volume de solventes de acondicionamento poderá proporcionar uma melhor activação da resina, aumentando a sua capacidade de reter os antibióticos em estudo.

#### (iii) Empacotamento da resina

O uso de cartuchos de plástico para o empacotamento, ao invés de colunas de vidro, foi também testado. A utilização de cartuchos de plástico revelou ser uma mais-valia para o processo de extracção, pois, permitiu a extracção de 50,5% da TC e de 8,3% do CPA presente na amostra padrão (Figura 3). Comparativamente à eficiência de extracção obtida com a coluna de vidro, utilizando as mesmas condições de acondicionamento (20mL MeOH+10mL HCl

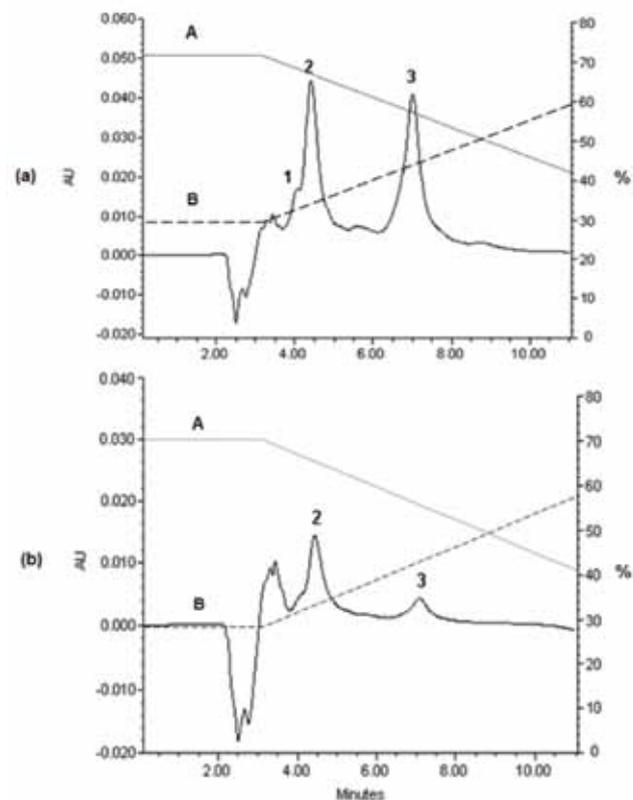


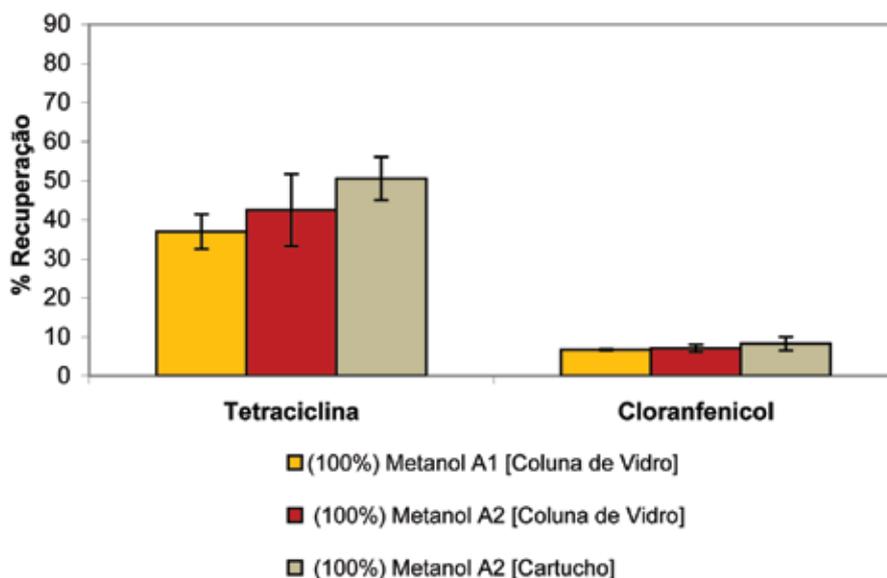
Figura 2: Cromatograma de uma solução padrão de TC + CPA a 20 ppm (a) Vs. Cromatograma de uma amostra de SPE eluída com metanol (b), obtido a 357nm. Ensaio realizado num equipamento de HPLC-DAD utilizando uma coluna de fase reversa C18. Modo de eluição em gradiente linear a um fluxo constante de 1 ml/min: (a) Solução aquosa de ácido oxálico 10 mM com TFA (0,05%), (b) ACN. (1) Epi-tetraciclina, (2) Tetraciclina e (3) Cloranfenicol.

0,5N+10mL Na<sub>2</sub>EDTA) e eluição (MeOH a 100%), obteve-se uma recuperação 8,0% superior para a TC e 1,2% para o CPA.

As colunas de vidro poderão possuir grupos silanol aos quais os antibióticos, nomeadamente a TC, se ligam de forma irreversível, diminuindo deste modo a sua recuperação. Esta interacção de quelatação da TC com grupos silanol das colunas de fase reversa é também referida em outros estudos por Oka<sup>16</sup> e Zhou<sup>19</sup>. Não estando estes grupos presentes nos cartuchos de plástico, a recuperação obtida é maior.

#### (iv) Tratamento prévio da amostra

Algumas alterações nos parâmetros da amostra de água padrão (enriquecida com os antibióticos em estudo) foram introduzidas devido à baixa recuperação obtida para o CPA. Assim, preparou-se uma amostra de água padrão (24 horas antes da extracção) sem a adição de Na<sub>2</sub>EDTA, de forma a testar se este composto tem uma influência negativa na extracção do CPA. Por outro lado, preparou-se outra amostra de água padrão extemporânea, adicionando Na<sub>2</sub>EDTA imediatamente antes da extracção por SPE, com o fim de testar se a baixa recuperação do CPA se encontra relacionada com a degradação da amostra logo após 24 horas.



**Figura 3:** Influência do acondicionamento da resina de SPE e do tipo de empacotamento utilizado, na recuperação de TC e CPA. Gráfico que representa a recuperação obtida para os antibióticos em estudo de uma resina de extração C18, após diferente acondicionamento da mesma com diversos volumes de solventes: (A1) 10 ml de MeOH + 10 ml de HCl 0,5 N + 10 ml de Na<sub>2</sub>EDTA (2g/L); (A2) 20ml de MeOH + 10 ml de HCl 0,5 N + 10 ml de Na<sub>2</sub>EDTA (2g/L); e diferente empacotamento da resina em coluna de vidro e em cartuchos de plástico. O solvente utilizado para eluição dos antibióticos da resina foi MeOH (100%) (n = 2 ensaios).

Os resultados obtidos nestas experiências podem-se dizer equivalentes aos registados anteriormente, apresentando uma recuperação para o CPA de 8,7% e de 8,2%, respectivamente, pelo que nenhum destes factores tem uma influência decisiva na recuperação do CPA. Porém, os resultados obtidos não podem ser tomados como conclusivos, pois estes ensaios foram apenas realizados uma vez.

Embora para a recuperação do CPA a preparação da amostra com Na<sub>2</sub>EDTA não seja determinante, a sua adição parece evitar que a TC complexa iões metálicos e subsequentemente afecte os resultados de extração. Vários autores estabelecem a sua relevância para a extração e análise da TC em diversas matrizes<sup>16,26-28</sup>.

### Conclusões e Perspectivas

Demonstra-se com estes resultados a possibilidade de desenvolver um método de análise conjunto para a TC e para o CPA (dada a sua afinidade para a coluna utilizada C18), e um método de análise cromatográfico individual para a STP. O método de extração por fase sólida revelou-se particularmente eficaz para a pré-concentração e extração da TC, sendo a extração máxima obtida para a TC de 77,1%, com 50:50 MeOH/Ác. Oxálico 10mM+TFA; contudo, a extração máxima registada para o CPA foi, comparativamente, baixa (15,3%, com 50:50 MeOH/Acetato de Amónio 3.2mM+PFPA) e a da STP nula.

No presente estudo, a utilização da técnica de HPLC-DAD revelou ser mais vantajosa para a análise dos antibióticos do que outras técnicas extensamente utilizadas para este tipo de análise, como TLC. Segundo Oka<sup>16</sup> et al., esta última

revela limites de detecção bastante razoáveis, na ordem dos 0,5–1mg/L. Contudo, a técnica de HPLC-DAD permitiu a obtenção de resultados mais satisfatórios, tendo o limite de detecção sido estabelecido na ordem dos 10µg/L – resultado validado por outros estudos já realizados<sup>17-18,29</sup>. Por outro lado, detectores de elevada sensibilidade, como os espectrómetros de massa, têm-se revelado potentes ferramentas na análise de antibióticos em diversas matrizes biológicas pois permitem uma detecção na ordem dos 0,5–1µg/L<sup>17,26</sup>. Porém, dada a sua elevada capacidade sensitiva estes métodos exigem uma grande quantidade de métodos preparativos da amostra, o que se revela desvantajoso numa análise de rotina pela sua morosidade.

Em amostras ambientais de diversos compartimentos aquáticos, foi observada por Huang<sup>24</sup> e Dietze<sup>30</sup>, e respectivos colaboradores, a presença de antibióticos em concentrações residuais (na ordem dos 0,04–36µg/L). Assim, é de remarcável importância, para obtenção de uma boa detecção destes compostos, o desenvolvimento de uma boa técnica de extração e pré-concentração dos antibióticos previamente à injeção da amostra no equipamento de HPLC.

Futuras experiências, que se esperam promissoras, foram já planeadas: (i) a utilização de cartuchos de SPE ligados em série, com dois tipos de resina (troca iónica, SCX, e fase reversa, C18), que permitirão a pré-concentração e extração de substâncias de carácter polar catiónico, como é o caso da STP, e por outro lado, de compostos como o CPA e a TC que são satisfatoriamente separados por resinas de fase reversa; (ii) o ajustamento do pH da amostra de água padrão para pH=4, seria um procedimento a considerar face aos resultados obtidos, e validados por

outros autores, tanto para a TC como para o CPA<sup>16</sup>; e finalmente, (iii) a utilização de uma coluna cromatográfica C8 de fase reversa<sup>15</sup>, ou uma coluna de fase normal (matriz hidrofílica) que permita aumentar ligeiramente o tempo de retenção da STP, possibilitaria uma análise por HPLC mais vantajosa para este composto.

### Referências bibliográficas

- Gilman AG. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 2003.
- Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am*. 1998 Mar;278(3):46-53.
- Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Apr;67(4):1494-502.
- Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002 Apr 1;74(7):1509-18.
- Granados M, Encabo M, Compañó R, Prat MD. Determination of tetracyclines in water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Chromatographia*. 2005 May;61(9-10):471-7.
- Yang S, Cha J, Carlson K. Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(18):2131-45.
- Himmelsbach M, Buchberger W. Residue analysis of oxytetracycline in water and sediment samples by high-performance liquid chromatography and immunochemical techniques. *Mikrochim Acta*. 2005;151(1-2):67-72.
- Karthikeyan KG, Meyer MT. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Sci Total Environ*. 2006;361(1-3):196-207.
- Reverté S, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003 Aug 29;1010(2):225-32.
- Zhu J, Snow DD, Cassada DA, Monson SJ, Spalding RF. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2001 Sep 14;928(2):177-86.
- Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R, Zuccato E. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J Chromatogr A*. 2005 Oct 28;1092(2):206-15.
- Sacher F, Lange FT, Brauch HJ, Blankenhorn I. Pharmaceuticals in groundwater analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J Chromatogr A*. 2001 Dec 14;938(1-2):199-210.
- Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Mehlich A, Ballwanz F, Kratz KL. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1998 Jul 31;815(2):213-23.
- Blackwell PA, Holten-Lützhøft HC, Ma HP, Halling-Sørensen B, Boxall A, Kay P. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection. *J Chromatogr A*. 2004 Aug 6;1045(1-2):111-7.
- Bovanová L, Brandsteterová E. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 Jun 2;880(1-2):149-68.
- Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A*. 2000 Jun 16;882(1-2):109-33.
- Shen H-Y, Jiang H-L. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Anal Chim Acta*. 2005;535(1-2):33-41.
- Bogdanov S. Current state of analytical methods for the detection of residues in bee products. *Trakia J Sci*. 2003;1(3):19-22.
- Zhou J, Gerhardt GC, Baranski A, Cassidy R. Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics coupled with reductive fast cyclic voltammetric detection. *J Chromatogr A*. 1999 Apr 16;839(1-2):193-201.
- van Bruijnsvoort M, Ottink SJ, Jonker KM, de Boer E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004 Nov 26;1058(1-2):137-42.
- Heller DN, Clark SB, Righter HF. Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2000 Jan;35(1):39-49.
- Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, Laganà A, Mele M, Nazzari M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005 Mar 4;1067(1-2):93-100.
- Pedroso RC. Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração [Dissertation]. [Porto Alegre]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007. 122p. Portuguese
- Huang C-H, Renew JE, Smeby KL, Pinkston K, Sedlak DL. Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *J Contemporary Water Res Educ*. 2001;120:30-40.
- Serrano JM, Silva M. Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a string cation-exchange chromatography non-derivatisation

- method with chemiluminescence detection. *J Chromatogr A*. 2006 Jun 9;1117(2):176–83.
26. Nakazawa H, Ino S, Kato K, Watanabe T, Ito Y, Oka H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999 Sep 10;732(1):55–64.
27. Yang S, Cha J, Carlson K. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005 Dec 2;1097(1–2):40–53.
28. Chico J, Rúbies A, Centrich F, Companyó R, Prat MD, Granados M. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008 Dec 12;1213(2):189–99.
29. Tyrpenou AE, Rigos GG, Athanassopoulou F. Determination of chloramphenicol residues in gilthead seabream (*Sparus Aurata* L.) tissues by HPLC-PDA. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2002;25(4):655–63.
30. Dietze JE, Scribner EA, Meyer MT, Kolpin DW. Occurrence of antibiotics in water from 13 fish hatcheries, 2001–2003. *Int J Environ Anal Chem*. 2005;85(15):1141–52.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. José Luís Capelo Martínez e à Dra. Raquel Rial Otero (Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, REQUIMTE Laboratório Associado Química Verde e Novas Tecnologias) pela disponibilização dos equipamentos e laboratórios, como por todo o apoio prestado ao acompanhamento do estudo.

Artigo recebido em 02.08.2008 e aprovado em 04.12.2008.