

AValiação de Três Sistemas de Solvente para Eluição Simultânea de Tetraciclina em Cartuchos de Extração de Fase Sólida

Luís H. M. Groth¹, Vanessa Gressler² e Ricardo L. R. Steinmetz²

¹Graduando em Farmácia pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiário da Embrapa Suínos e Aves, grothluis@boll.com.br

²Analista da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: cromatografia, espectrometria de massas, tratamento de efluentes da suinocultura, tetraciclina.

INTRODUÇÃO

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos usados no tratamento e prevenção de doenças humanas e animais as quais são capazes de inibir o crescimento ou inativar fungos ou bactérias (1). Uma variedade destes antibióticos é utilizada no tratamento e prevenção de patologias durante o crescimento e terminação de suínos como é o caso das quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, macrolídeos entre outros. Parte destas substâncias administradas é excretada nos dejetos e por consequência atinge corpos d'água e solos, podendo ocasionar impacto ambiental, bem como o surgimento de bactérias resistentes. Para minimizar possíveis impactos, o tratamento destes dejetos é necessário. Uma alternativa tecnológica é a utilização de biodigestores, que possibilitam a agregação de valor ao resíduo mediante a utilização do biogás produzido em sistemas de geração de energia e calor. Na busca de alternativas de tratamento para estes resíduos, é necessário conhecer e quantificar as concentrações destes antibióticos encontradas no meio ambiente. Segundo a literatura, metodologias por SPE-LC-MS/MS são amplamente utilizadas (2,3). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi adaptar/desenvolver e otimizar uma metodologia para análise de tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina) em amostras de dejetos de suínos submetidas à biodigestão anaeróbia.

MATERIAL E MÉTODOS

Um volume de 10 mL da amostra líquida (dejetos de suíno) foi transferida para tubos falcon de 50 mL. Em seguida foram adicionadas concentrações conhecidas dos antibióticos nas amostras (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina, 1 µg/mL) para posterior cálculo de recuperação. Portanto, Na₂EDTA e H₂SO₄ 40% foram adicionados a fim de garantir condições de extração dos antibióticos escolhidos. Os tubos foram submetidos à agitação, centrifugação e posterior extração em fase sólida (SPE) com cartuchos HLB. Na etapa de SPE, os cartuchos foram pré-condicionados com MeOH, HCl 0,5 M e H₂O MilliQ para então aplicação da amostra (2 mL). Na sequência foi realizada a etapa de lavagem (*clean-up*) com 5% de MeOH em água, H₂O, hexano sob vácuo. A etapa de eluição da amostra foi testada utilizando três sistemas de solvente distintos (1) CH₂Cl₂/acetona (3:2 v/v), (2) MeOH e (3) MeOH/2% de ácido fórmico. Após eluição, as amostras foram secas em N_{2(g)}, ressuspensas em 1 mL de MeOH:H₂O (2:3 v/v) e filtradas em filtros PTFE de 0,22 µm para posterior quantificação no LC-MS/MS. O sistema de análise utilizado consistiu em um cromatógrafo líquido Surveyor Plus acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo TSQ Quantum Access Max ambos da Thermo Scientific. A separação cromatográfica foi realizada em coluna AcclaimTM 120 C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. O gradiente de eluição utilizado consistiu de duas fases (eluente A, água MilliQ com 0,1% de ácido fórmico e eluente B, acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) com o seguinte sistema de eluição: 0-2 min isocrático 95% A e 5% B; 2-3 min gradiente até 25% de B; 3-7 min isocrático 25% B; 7-12 min gradiente até 50% de B; 12-15 min isocrático até 50% de B; 15-16 min gradiente até 100% de B; 16-18 min isocrático até 100% de B; 18-18,5 min gradiente até 5% de B; 18,5-22 min isocrático até 5% de B, em um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada por electrospray com ionização no modo positivo. O modo de quantificação para os resíduos de antibióticos utilizados foi o Selected Reaction Monitoring (SRM). Os íons precursores monitorados foram os *m/z* 461,1, 445,1, 479,1, 443,1 e 445,1 para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina, respectivamente. Os íons produto monitorados foram: *m/z* 426,3 (17 eV) e 443,3 (11 eV) para oxitetraciclina; *m/z* 410,3 (18 eV) e 427,4 (11 eV) para tetraciclina; *m/z* 462,3 (16 eV) e 444,3 (19 eV) para clortetraciclina; *m/z* 201,1 (33 eV) e 426,3 (13 eV) para metaciclina e *m/z* 321,2 (30 eV) e 428,3 (17 eV) para doxiciclina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha ou o desenvolvimento do método analítico para quantificação de substâncias é crucial para a obtenção de resultados confiáveis. Em se tratando de antibióticos, o método mais utilizado é o por SPE-LC-MS/MS. Quando uma metodologia é desenvolvida ou adaptada utilizando SPE, diferentes parâmetros do processo de extração devem ser levados em consideração e testados, sendo um dos mais importantes a escolha do solvente de eluição. A eficiência de três solventes (CH₂Cl₂/acetona, MeOH e MeOH com 2% ácido fórmico) frequentemente utilizados na eluição dos compostos em cartuchos de SPE durante o preparo de amostras para análise de antibióticos (incluindo as tetraciclina) foi comparada. As recuperações foram calculadas pelo percentual da área do sinal cromatográfico de uma amostra dopada com padrões de antibióticos antes do processo de extração em comparação à área do pico cromatográfico de amostras dopadas depois do processo de extração. Os resultados mostraram poderes

de eluição bastante diferenciados entre os solventes testados. Dentre eles, o MeOH com 2% de ácido fórmico foi o mais eficiente, melhorando em mais de 10x o poder de eluição/extração das tetraciclinas estudadas quando comparado ao sistema de solvente com CH₂Cl₂/acetona. Os resultados de recuperação obtidos utilizando MeOH com 2% de ácido fórmico também foram melhores quando comparados à eluição apenas com MeOH (Tabela 1), sendo este escolhido para a continuidade dos testes de desenvolvimento da metodologia analítica. A Figura 1 mostra o cromatograma obtido após a otimização da etapa de eluição, no qual cinco picos (referentes aos cinco antibióticos testados) bem resolvidos e com intensidades adequadas para quantificação são visualizados.

CONCLUSÕES

Neste trabalho a etapa de eluição das amostras em cartuchos de SPE para análise de tetraciclinas em dejetos de suínos foi otimizada através da utilização de MeOH com 2% de ácido fórmico, o qual mostrou melhores recuperações (55,98%, 40,96%, 21,33%, 12,39% e 16,76% para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina respectivamente) quando comparado aos outros sistemas testados. Entretanto, para o desenvolvimento e otimização de metodologia outros parâmetros precisam ser avaliados. Assim, futuros testes envolvendo saturação do cartucho, volume de eluição, número de extrações entre outros, ainda são necessários. Com tais otimizações, os percentuais de recuperação ainda podem ser melhorados, viabilizando ainda mais a análise de tetraciclinas por SPE-LC-MS/MS.

REFERÊNCIAS

1. GUIMARÃES, D.; MOMESSO, S. DA.; PUPO, T. Revisão. Antibióticos: **importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes**, v.33(3), p. 667–679, 2010.
2. ZHOU, L-J.; YING, G-G.; LIU, S.; ZHANG, R-Q.; LAI, H-J.; CHEN, Z-F.; PAN, C-G. **Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China**. Science of the Total Environment, v.444, p. 183–195, 2013.
3. BEN, W.; QIANG, Z.; ADAMS, C.; ZHANG, H.; CHEN, L. **Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1202, p. 173–180, 2008.
4. PAN, X. et al. **Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China**. Chemosphere, v.84(5), p. 695–700, 2011.
5. PAN, X. et al. **Simultaneous determination of three classes of antibiotics in the suspended solids of swine wastewater by ultrasonic extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry**. Journal of Environmental Sciences, v.23(10), p. 1729–1737, 2011.

Agradecimentos: a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC

Tabela 1. Média (\pm DP) dos resultados de recuperação dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, metaciclina e doxiciclina em amostras de dejetos suíno frente à três diferentes solventes de eluição no sistema de SPE.

| | CH ₂ Cl ₂ /acetona (3:2 v/v) | MeOH | MeOH com 2% ácido fórmico |
|------------------|--|------------------|---------------------------|
| Oxitetraciclina | 3,94 \pm 0,86 | 33,29 \pm 3,86 | 55,98 \pm 2,98 |
| Tetraciclina | 3,94 \pm 0,95 | 23,74 \pm 3,55 | 40,96 \pm 2,75 |
| Clortetraciclina | 1,83 \pm 0,76 | 9,82 \pm 1,99 | 21,33 \pm 2,49 |
| Metaciclina | 0,33 \pm 0,08 | 5,27 \pm 0,95 | 12,39 \pm 1,50 |
| Doxiciclina | 1,16 \pm 0,35 | 7,89 \pm 1,26 | 16,76 \pm 1,62 |

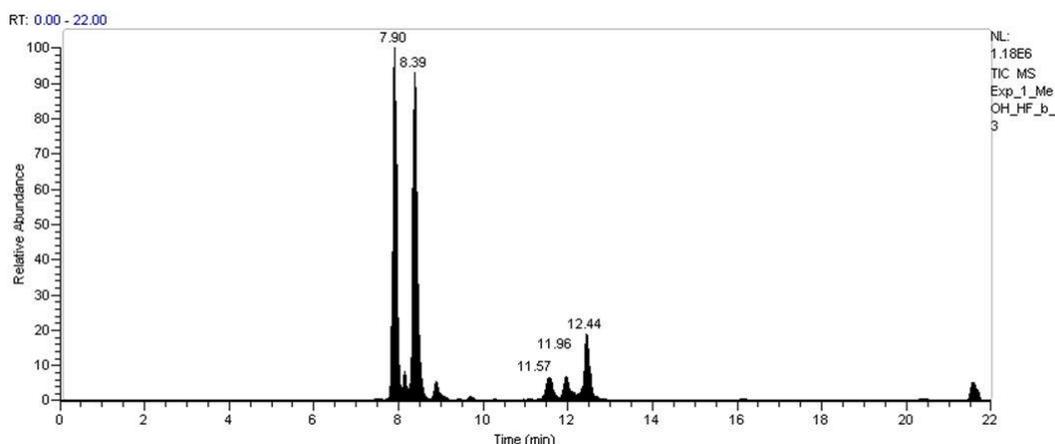


Figura 1. Cromatograma obtido após a otimização da etapa de eluição com MeOH/2% ácido fórmico. Oxitetraciclina (t_R = 7,90 min), tetraciclina (t_R = 8,39 min), clortetraciclina (t_R = 11,57 min), metaciclina (t_R = 11,96 min) e doxiciclina (t_R = 12,44 min).