

**Universidade Federal de Alfenas  
Unifal-MG**

**Lailah Cristina de Carvalho Abrão**

**Desenvolvimento de um disco de extração em fase sólida molecularmente  
impresso para a pré-concentração seletiva de tetraciclinas em amostras de  
água seguida de análise por HPLC-UV**

**Alfenas/MG**

**2013**

**Lailah Cristina de Carvalho Abrão**

**Desenvolvimento de um disco de extração em fase sólida molecularmente  
impresso para a pré-concentração seletiva de tetraciclinas em amostras de  
água seguida de análise por HPLC-UV**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.

**Alfenas/MG**

**2013**

Abrão, Lailah Cristina de Carvalho.

Desenvolvimento de um disco de extração em fase sólida  
molecularmente impresso para a pré-concentração seletiva de  
tetraciclina em amostras de água seguida de análise por HPLC-UV /  
Lailah Cristina de Carvalho Abrão. - 2013.

63 f. -

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade  
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Impressão Molecular. 2. Extração em Fase Sólida. 3. Tetraciclina.  
4. Água. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD: 615.9

Lailah Cristina de Carvalho Abrão

Desenvolvimento de um disco de extração em fase sólida molecularmente impresso para a pré-concentração seletiva de tetraciclinas em amostras de água seguida de análise por HPLC-UV

A Banca Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 30 / 08 / 13 .

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Instituição: Unifal-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Keyller Bastos Borges

Instituição: UFSJ

Assinatura:



Prof. Dr. Pedro Orival Lucas

Instituição: Unifal-MG

Assinatura:



Dedico a meus pais, que sempre me estimularam a seguir pelo caminho do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus passos e fortalecer a minha fé;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, por todo o conhecimento compartilhado, pela confiança depositada em mim e, acima de tudo, pela paciência e disponibilidade em todos os momentos;

A meus pais, pelo amor incondicional e por todo o apoio para a realização de mais um sonho;

A meu irmão, pelo amor e pela amizade, mesmo longe;

A todos os amigos e funcionários do LATF – Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – pela convivência agradável e divertida;

À querida Patrícia Penido Maia, pelo suporte na execução deste trabalho, pelo carinho e pela amizade;

Às amigas Isabela Baldim e Mariane Gonçalves, que me receberam tão bem, tornando mais fáceis os primeiros momentos desta caminhada;

À amiga Suellen Rennó, pelas dicas sempre úteis e, principalmente, pela amizade e pelo companheirismo;

À amiga Aline Swerts, pela companhia especial durante a coleta das amostras;

À Profa. Isarita Martins, pela supervisão carinhosa no estágio docente, e à Turma 2009/1 do curso de Farmácia, pela oportunidade de aprender com vocês;

À Unifal-MG;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

E a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes em minha vida durante estes dois anos.

Muito obrigada.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

## RESUMO

Os poluentes orgânicos emergentes vêm se tornando fonte crescente de preocupação ambiental. Entre as classes mais comumente encontradas em amostras de águas estão os antibióticos, com destaque para as tetraciclinas. A ocorrência destes analitos em níveis muito baixos torna necessária a utilização de técnicas de extração seletivas e sensíveis capazes de pré-concentrar tais analitos na presença de concomitantes mais abundantes. Nesse sentido, acredita-se que os polímeros de impressão molecular (MIP) se enquadram perfeitamente para tal aplicação principalmente devido a características como seletividade e sensibilidade. Adicionalmente, o emprego de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e o glicerol dimetacrilato (GDMA) durante a síntese aumenta a quantidade de hidroxilas superficiais, que por sua vez tornam o material mais compatível com sistemas aquosos, uma vez que há predomínio de interações de hidrogênio entre a água e as hidroxilas superficiais, minimizando a perturbação desse solvente na ligação analito-MIP. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um disco de MIP com revestimento superficial hidrofílico para extração de tetraciclinas de amostras de águas seguida de análise por HPLC-UV. O MIP foi sintetizado utilizando-se oxitetraciclina como molécula-modelo, ácido metacrílico como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato como agente de ligação cruzada, 2,2'-azo-bis-isobutironitrila como iniciador radicalar e HEMA e GDMA como comonômeros hidrofílicos. O material (1 g) foi então comprimido na forma de um disco de 40 mm de d.i. por 2 mm de espessura e empregado em procedimentos de extração em fase sólida em disco. A metodologia mostrou-se promissora para a extração seletiva de tetraciclinas com linearidade, precisão e exatidão adequadas e, com limites de quantificação da ordem de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Palavras-chaves: Polímeros de impressão molecular. Extração em fase sólida. Tetraciclinas. Água.

## ABSTRACT

Emerging organic pollutants have caused great environmental concern. Among the most common pharmaceuticals, antibiotics are in focus, especially tetracyclines. The occurrence of these analytes at low levels makes necessary the use of selective and sensitive extraction techniques to enrich those compounds even in the presence of other concomitant interferents. In this way, it is thought that molecularly imprinted polymers (MIPs) fit perfectly to this application mainly due to their characteristics of selectivity and sensitivity. In addition, the use of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and glycerol dimethacrylate (GDMA) during the synthesis increases the number of surface hydroxyl groups, which in turns makes the polymer more compatible with aqueous systems, since they enhance the hydrogen bonds between the water and surface hydroxyl groups, minimizing the interference of this solvent in the complex analyte-polymer. Thus, the objective of this project was to develop a MIP disk for the extraction of tetracyclines from water samples followed by the HPLC-UV analysis. The MIP was synthesized using oxytetracycline as template, methacrylic acid as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker agent, 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile as radical initiator and HEMA and GDMA as hydrophilic monomers. The polymer was then compressed in a disk form of 40 mm of internal diameter and 2 mm of thickness and this system was used in solid-phase extraction procedures. The developed method showed great results for selective extraction of tetracyclines with good linearity, precision and accuracy showing limits of quantification of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Key words: Molecularly imprinted polymers. Solid-phase extraction. Tetracyclines. Water.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AIBN</b> -	2,2'-azo-bis-iso-butironitrila
<b>ALC</b> -	Agente de ligação cruzada
<b>ANVISA</b> -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CONAMA</b> -	Conselho Nacional do Meio Ambiente
<b>CTC</b> -	Clortetraciclina
<b>DAD</b> -	Detector de arranjo de diodos
<b>DOX</b> -	Doxiciclina
<b>ECOSAR</b> -	<i>Ecological Structure Activity Relationships</i>
<b>EDTA</b> -	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>EGDMA</b> -	Etileno glicol dimetacrilato
<b>US-EPA</b> -	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<b>GDMA</b> -	Glicerol dimetacrilato
<b>GMMA</b> -	Glicerol monometacrilato
<b>HEMA</b> -	2-hidroxietil metacrilato
<b>HILIC</b> -	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
<b>HPLC</b> -	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>IR</b> -	Iniciador radicalar
<b>MS</b> -	Espectrometria de massas
<b>MAA</b> -	Ácido metacrílico
<b>MF</b> -	Monômero funcional
<b>MM</b> -	Molécula-modelo
<b>MIP</b> -	Polímero de impressão molecular
<b>MISPE</b> -	Extração em fase sólida molecularmente impressa
<b>NIP</b> -	Polímero não impresso
<b>NCCOS</b> -	<i>National Centers for Coastal Ocean Science</i>
<b>OTC</b> -	Oxitetraciclina
<b>PEIAR</b> -	<i>Pharmaceuticals in the Environment, Information for Assessing Risk</i>
<b>SPE</b> -	<i>Solid-phase extraction</i>
<b>TC</b> -	Tetraciclina
<b>UV</b> -	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições cromatográficas da análise.....	31
Tabela 2 -	Valores de pKa das tetraciclinas.....	37
Tabela 3 -	Estado de ionização dos grupamentos ionizáveis das tetraciclinas e do MF em algumas faixas de pH.....	38
Tabela 4 -	Condições experimentais pré e pós-otimização.....	49
Tabela 5 -	Resultados dos testes de linearidade.....	50
Tabela 6 -	Resultados de precisão e exatidão para OTC, TC, CTC e DOX.....	53
Tabela 7 -	Métodos de análise de tetraciclinas em amostras de água.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura geral das tetraciclinas com os sítios de epimerização nas posições <i>a</i> e <i>b</i> .....	18
Figura 2 -	Esquema de síntese dos polímeros.....	29
Figura 3 -	Desenho esquemático do sistema de extração em disco.....	30
Figura 4 -	Comparação da capacidade adsortiva de MIP-1, MIP-2, NIP-1 e NIP-2 realizada com amostras de água adicionadas de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 100 µg L <sup>-1</sup> .....	33
Figura 5 -	Estrutura geral das tetraciclinas.....	35
Figura 6 -	Influência do pH na resposta analítica empregando-se amostra fortificada com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 200 µg L <sup>-1</sup> .....	36
Figura 7 -	Sítios de ionização das tetraciclinas.....	37
Figura 8 -	Cromatograma de amostra de água (pH 5) adicionada de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4), na concentração de 200 µg L <sup>-1</sup> . Extração: MIP-1. Eluição em fase móvel.....	39
Figura 9 -	Influência do volume de extração (amostra) na resposta analítica empregando-se água fortificada com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 200 µg L <sup>-1</sup> .....	40
Figura 10 -	Cromatograma de amostra de água (pH 5) sem adição dos padrões (“branco”), apresentando sinais de OTC (1) e TC (2). Extração: MIP-1. Eluição: fase móvel. Condicionamento: 10 mL de fase móvel.....	41
Figura 11 -	Cromatograma de amostra de água (pH 5) sem adição dos padrões (“branco”). Extração: MIP-1. Eluição: fase móvel. Condicionamento: 20 mL de fase móvel.....	41
Figura 12 -	Influência da natureza do solvente de eluição na resposta analítica empregando-se amostras fortificadas com os padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 200 µg L <sup>-1</sup> .....	43
Figura 13 -	Cromatograma de amostra de água (pH 5) adicionada de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4), na concentração de 200 µg L <sup>-1</sup> . Extração: MIP-1. Eluição: acetona.....	44

Figura 14 -	Influência do volume de ressuspensão na resposta analítica empregando-se amostras fortificadas com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	45
Figura 15 -	Cromatograma de padrão misto de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 10 $\text{mg L}^{-1}$ (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ (50:50).....	47
Figura 16 -	Cromatograma de padrão misto de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 10 $\text{mg L}^{-1}$ (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ (10:90).....	47
Figura 17 -	Cromatograma de padrão misto de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4) na concentração de 10 $\text{mg L}^{-1}$ (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ (30:70).....	48
Figura 18 -	Cromatograma de padrão misto de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4) na concentração de 10 $\text{mg L}^{-1}$ (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ (20:80), fluxo de 1 $\text{mL min}^{-1}$ (0 – 3 minutos); acetonitrila:ácido oxálico 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ (25:75), fluxo de 1,6 $\text{mL min}^{-1}$ (3,01 – 13 minutos); acetonitrila:ácido oxálico 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ (20:80), fluxo de 1,6 $\text{mL min}^{-1}$ (13,01 – 15 minutos).....	48
Figura 19 -	Comparação entre condições pré e pós-otimização do método de extração e análise. Extrações realizadas com amostras fortificadas na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	50
Figura 20 -	Curva analítica para oxitetraciclina.....	51
Figura 21 -	Curva analítica para tetraciclina.....	51
Figura 22 -	Curva analítica para clortetraciclina.....	52
Figura 23 -	Curva analítica para doxiciclina.....	52
Figura 24 -	Cromatograma de amostra de água (pH 5) adicionada de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4), na concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (limite de quantificação)..	54
Figura 25 -	Estabilidade dos analitos em água.....	54
Figura 26 -	Cromatograma da amostra 3. Presença de substância interferente (1) em tempo de retenção não correspondente ao das tetraciclinas.....	56
Figura 27 -	Cromatograma da amostra 4.....	57
Figura 28 -	Cromatograma da amostra 5. Presença de substância interferente (1) em tempo de retenção não correspondente ao das tetraciclinas.....	57

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	POLUENTES ORGÂNICOS EMERGENTES.....	15
2.2	TETRACICLINAS.....	16
2.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	19
2.4	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR.....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	27
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	27
4.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	28
4.3	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM DISCO (SPE).....	30
4.4	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	31
4.5	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	31
4.6	AMOSTRAS.....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1	COMPARAÇÃO ENTRE MIP-1, MIP-2, NIP-1 E NIP-2 NA EXTRAÇÃO DE TETRACICLINAS.....	33
5.2	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	35
<b>5.2.1</b>	<b>pH da amostra</b> .....	36
<b>5.2.2</b>	<b>Volume de extração</b> .....	39
<b>5.2.3</b>	<b>Volume de condicionamento do disco</b> .....	40
<b>5.2.4</b>	<b>Solvente de eluição</b> .....	42
<b>5.2.5</b>	<b>Volume de ressuspensão</b> .....	44
<b>5.2.6</b>	<b>Volume de injeção</b> .....	45
5.3	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	46
5.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	50
5.5	AMOSTRAS .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Poluentes orgânicos emergentes são compostos químicos presentes em produtos como medicamentos, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos e outros, que podem ser encontrados tanto em matrizes ambientais quanto biológicas. Além disso, esses compostos não são usualmente monitorados e ainda não possuem legislação regulatória correspondente, apesar de apresentarem risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente, como disfunções endócrinas, reprodutivas, metabólicas, além da indução de bactérias mais resistentes (SILVA; COLLINS, 2011).

Os antibióticos são, provavelmente, a família de fármacos de maior sucesso desenvolvida até o momento (MARTINEZ, 2009). Trata-se de uma classe de medicamentos muito utilizada tanto na medicina humana quanto na veterinária. Embora o uso humano seja restrito a propósitos terapêuticos, o uso veterinário inclui também propósitos subterapêuticos, como profilaxia e promoção do crescimento (DOLLIVER; GUPTA, 2008).

Muitos antibióticos de uso humano, vegetal e animal são eliminados intactos ou biotransformados no meio ambiente, seja através de estações de tratamento de efluentes, do descarte direto no ambiente ou por lixiviação (HOA et al., 2011).

Embora o Brasil ainda não tenha uma política de descarte de medicamentos bem definida, algumas drogarias chegaram a implantar sistemas de coleta para posterior incineração; porém, o acesso do consumidor a estes postos de coleta é bastante difícil, sendo poucos os Estados no Brasil com este sistema implantado.

Além disso, nem sempre o tratamento de efluentes é eficiente para a remoção destes compostos resultantes do metabolismo de excreção, que são então lançados diretamente ao ambiente.

Como o assunto é relativamente novo, o impacto da presença de medicamentos no meio ambiente é pouco conhecido, uma vez que as concentrações encontradas normalmente são baixas e não há estudos de toxicidade, nem avaliação de efeitos da exposição crônica a estas doses, na maioria das vezes, subterapêuticas.

Do ponto de vista analítico, são necessários métodos cada vez mais seletivos e sensíveis, capazes de identificar o analito de interesse entre tantas outras substâncias que possam estar presentes na matriz e, detectá-lo em concentrações baixas.

Dentre as técnicas utilizadas para concentrar analitos, a extração em fase sólida (SPE) é uma das mais comuns e, em se tratando de amostras ambientais, a SPE empregando-se

discos é interessante, pois permite a passagem de volumes maiores de amostra em menor tempo, devido a maior superfície de contato dos discos em relação aos cartuchos.

Com a finalidade de aumentar a seletividade da extração, polímeros com sítios de reconhecimento pré-moldados para uma dada molécula ou classe, como os polímeros de impressão molecular (MIPs), podem ser empregados como sorvente.

A maior seletividade obtida através do emprego de MIPs permite alcançar, com detector ultravioleta, limites de quantificação próximos daqueles anteriormente alcançados com sistemas de detecção mais sensíveis, como a espectrometria de massas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POLUENTES ORGÂNICOS EMERGENTES

Poluentes emergentes são compostos ainda não regulados pela legislação vigente de qualidade de águas, mas que podem apresentar riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Eles englobam diversos tipos de substâncias, incluindo medicamentos, drogas de abuso, produtos de higiene pessoal, esteroides e hormônios, surfactantes, compostos perfluorados, retardantes de chama, aditivos e agentes industriais, aditivos da gasolina, assim como seus produtos de transformação (LA FARRÉ et al., 2008).

No Brasil, o CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, órgão responsável por estabelecer normas, critérios e padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente, não apresenta legislação específica para medicamentos em águas. Assim como a Portaria 2914 do Ministério da Saúde, publicada em 2011, que estabelece vários parâmetros para água potável, entre eles bactérias e até alguns compostos químicos inorgânicos como cobre, chumbo e mercúrio, mas também não traz limites para poluentes emergentes, como medicamentos.

Na Europa, a *The Water Framework Directive* ou *Directive 2000/60/EC* estabelece um aspecto inovador de gerenciamento de águas e define responsabilidades específicas para os países membros no que diz respeito à proteção de ecossistemas aquáticos com metas para melhorar a qualidade das águas no período de 2009 – 2015. Uma nova Diretiva publicada em 2008 (Diretiva 2008/105/EC) estabelece limites para diversas substâncias conhecidas como Padrões de Qualidade Ambiental, mas também não aborda medicamentos.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (US-EPA), através de seu NCCOS (*National Centers for Coastal Ocean Science*), criou uma base de dados chamada *Pharmaceuticals in the Environment, Information for Assessing Risk* (PEIAR). Esta base inclui os 200 fármacos mais prescritos nos Estados Unidos entre 2003 e 2004, além de fármacos antibacterianos e antilipêmicos, que são de interesse particular do programa.

Nesta base são encontradas informações como o número de prescrições dispensadas em 2004 nos Estados Unidos, tempos de meia vida biológica e ambiental, concentração dos medicamentos no meio ambiente e alguns dados de toxicidade.

Os medicamentos são uma classe importante de poluentes emergentes que podem alcançar o meio ambiente com o uso indiscriminado e crescente pela sociedade. São substâncias desenvolvidas para ação biológica em concentrações baixas, da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ ; portanto, efeitos indesejáveis ao ecossistema e aos seres humanos devem ser investigados (LÓPEZ-SERNA et al., 2013).

Muitas vezes, as estações de tratamento de água e efluentes não apresentam processos capazes de degradar ou eliminar estes produtos completamente, principalmente aqueles que apresentam elevada solubilidade em água (SILVA; COLLINS, 2011).

Uma vez no meio ambiente, dependendo do compartimento em que se encontram – águas subterrâneas, superficiais, plantas de tratamento de água e esgoto ou água potável – diferentes transformações podem ocorrer, dando origem a produtos com comportamento ambiental e perfil ecotoxicológico diferentes, podendo ser mais persistentes e tóxicos que o composto correspondente (LA FARRÉ et al., 2008).

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) combinada com a espectrometria de massas e outras técnicas relacionadas, como a cromatografia líquida de ultra performance com o mesmo detector, têm demonstrado robustez e sensibilidade para a detecção destes compostos e de seus produtos de transformação. Diferente da cromatografia gasosa, a cromatografia líquida apresenta a vantagem de poder analisar compostos polares sem derivatização (LA FARRÉ et al., 2008).

## 2.2 TETRACICLINAS

Os antibióticos são uma classe de medicamentos muito utilizada tanto na medicina humana quanto na veterinária. Embora o uso humano seja restrito a propósitos terapêuticos, o uso veterinário inclui também propósitos subterapêuticos, como profilaxia e promoção do crescimento (DOLLIVER; GUPTA, 2008).

Muitos antibióticos de uso humano, vegetal e animal são eliminados intactos ou biotransformados no meio ambiente, seja através de estações de tratamentos de efluentes, do descarte direto no ambiente ou por lixiviação (HOA et al., 2011).

Em ecossistemas que sofrem constantemente com o descarte de antibióticos, os microorganismos são expostos a estes fármacos em níveis subterapêuticos. Uma vez que concentrações subinibitórias geram respostas de transcrição específicas no material genético

das bactérias, a presença de antibióticos modificará necessariamente a atividade metabólica da microbiota presente em ambientes poluídos (MARTINEZ, 2009).

O uso de ampla variedade de antibióticos em grandes quantidades, incluindo aqueles não biodegradáveis, leva à permanência deles ou de seus resíduos no ambiente aquático exercendo pressão seletiva por muito tempo. Este processo tem resultado no surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados em aquicultura, no aumento de patógenos de peixes resistentes a antibióticos, na transferência destes determinantes de resistência a bactérias de animais terrestres e patógenos humanos e em alterações da flora bacteriana tanto em sedimentos quanto na água (CABELLO, 2006).

Os antibióticos veterinários mais comumente utilizados em doses subterapêuticas incluem tetraciclina, ionóforos, peptídeos, macrolídeos, sulfonamidas e  $\beta$ -lactâmicos. Com exceção dos ionóforos, a maioria dos antibióticos veterinários é similar àqueles utilizados no tratamento das doenças humanas (DOLLIVER; GUPTA, 2008).

As tetraciclina são antibióticos caracterizados pelo amplo espectro de atividade, grau de segurança relativamente alto e baixo custo de produção e venda (HARNISZ; GOŁAŚ; PIETRUK, 2011). Elas são amplamente utilizadas para o tratamento de mastite bovina e são também adicionadas em doses subterapêuticas à ração animal para fins profiláticos e de promoção de crescimento (VERA-CANDIOTI; OLIVIERI; GOICOECHEA, 2010).

As tetraciclina são transportadas ativamente para o interior da célula bacteriana onde se ligam à subunidade 30S dos ribossomos, exercendo efeito bacteriostático através da inibição da síntese proteica (OKA; ITO; MATSUMOTO, 2000).

As tetraciclina constituem um grande grupo de antibióticos com estrutura básica e atividades comuns. Enquanto a clortetraciclina (CTC) e a oxitetraciclina (OTC) são sintetizadas pelo *Streptomyces aureofaciens* e *Streptomyces rimosus*, respectivamente, a tetraciclina (TC) é um antibiótico semi-sintético, produzido a partir da clortetraciclina. A doxiciclina (DOX) também é um derivado semi-sintético (MAMANI, 2007).

As estruturas químicas deste grupo de antibióticos são intimamente relacionadas e derivadas de um núcleo hidroftaceno comum que contém quatro anéis fundidos (HERNANDÉZ; BORRULL; CALULL, 2003). São compostos complexos que podem possuir vários grupos funcionais dentro da mesma molécula. Portanto, sob condições diferentes de pH, os antibióticos podem apresentar propriedades neutras, catiônicas, aniônicas ou zwitteriônicas (KÜMMERER, 2009). Elas são solúveis em água, altamente solúveis em álcoois, dimetil formamida e dimetil sulfóxido; porém são moderadamente solúveis em

solventes não polares, como clorofórmio, acetato de etila e diclorometano (O'CONNOR; AGA, 2007).

As tetraciclinas apresentam, em sua estrutura química, cinco radicais que podem ser modificados (FIGURA 1). Estas moléculas podem sofrer epimerização em dois sítios distintos, dando origem a epímeros com atividade microbiológica, provavelmente devido a reconversão na tetraciclina de origem, o que pode dificultar a quantificação de tais compostos (KHONG; HAMMEL; GUY, 2005).

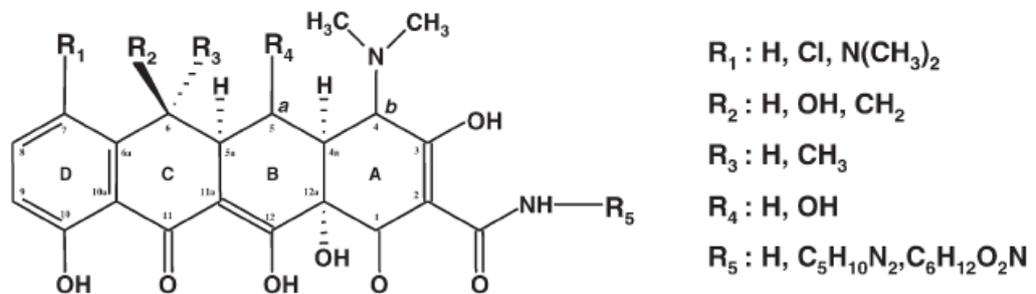


Figura 1 – Estrutura geral das tetraciclinas com os sítios de epimerização nas posições *a* e *b*.

Fonte: KHONG; HAMMEL; GUY (2005).

A ampla utilização de tetraciclinas leva ao aumento do fator de resistência, sendo necessário, portanto, um monitoramento por parte das agências regulatórias e métodos cromatográficos precisos (MAIA; RATH; REYES, 2008).

Segundo a base de dados PEIAR (*Pharmaceuticals in the Environment, Information for Assessing Risk*) da Agência de Proteção Ambiental Americana, em um levantamento do número de prescrições médicas realizado em 2004, entre os antibióticos da classe das tetraciclinas, a clortetraciclina foi a mais prescrita, com 287 prescrições; em seguida vieram o cloridrato de oxitetraciclina e o cloridrato de tetraciclina, com 278 e 202 prescrições respectivamente. O hclato de doxiciclina apareceu por último, com 115 prescrições. Vale ressaltar que esses valores devem ser ainda maiores, pois não contemplam as vendas realizadas sem receita médica (AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL AMERICANA, PEIAR, 2004).

Os tempos de meia vida, encontrados na mesma base de dados, são preocupantes. Enquanto a meia vida biológica é de 6 a 10 horas para OTC e 6 a 12 horas para TC, no meio ambiente, este valor passa a ser de 101 a 364 dias para OTC e maior ou igual a 365 dias para TC. Segundo dados de literatura, as concentrações encontradas em amostras ambientais (água, sedimentos, solos) variam da ordem de  $ng L^{-1}$  até  $mg L^{-1}$  para estes analitos.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) também detém o programa ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships*), que através da relação estrutura-atividade, prediz a toxicidade aquática de substâncias baseando-se na similaridade destas estruturas com aquelas que já apresentam este dado bem definido. Os valores de toxicidade para as tetraciclinas são relativamente altos, da ordem de  $\text{mg L}^{-1}$ .

Como as concentrações tóxicas são altas e ainda não há limites definidos pela legislação vigente, o desenvolvimento de método neste caso deve visar a menor concentração passível de medição validada.

As tetraciclinas podem ser determinadas, com sucesso, em diversas matrizes utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no modo reverso e diferentes modos de detecção (MAIA; RATH; REYES, 2008).

A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS) é mais utilizada que a cromatografia gasosa com o mesmo detector por apresentar maiores seletividade e compatibilidade com antibióticos pouco voláteis e altamente polares (ZHOU; MASKAOUI; LUFADJEU, 2012), como as tetraciclinas.

As fases estacionárias mais comumente empregadas nas análises de antibióticos são as fases reversas do tipo  $\text{C}_{18}$  e, as fases móveis típicas compreendem misturas de água com acetonitrila ou metanol, adicionadas de modificadores como ácido fórmico, acetato de amônio ou ácido oxálico, para melhorar a eficiência da ionização e auxiliar no controle do pH (HERNANDÉZ et al., 2007).

Em função da alta polaridade destes analitos, geralmente são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso e os problemas de adsorção das tetraciclinas aos grupos silanóis das colunas de fase reversa podem ser resolvidos com a adição de ácido oxálico à fase móvel. As tetraciclinas, em soluções ácidas e neutras, apresentam forte absorção no ultravioleta entre os comprimentos de onda de 290 e 360 nm, sendo, portanto, a HPLC acoplada aos detectores UV, o método de detecção convencional para a determinação destes analitos (DENOBILO; NASCIMENTO, 2004).

### 2.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Com a finalidade de eliminar interferentes e concentrar o analito, permitindo assim sua determinação com exatidão e precisão adequadas, faz-se necessária uma técnica apropriada de

preparo de amostra, que deve ser de fácil manuseio, rápida, barata e compatível com a faixa de detecção do instrumento de análise, além de apresentar bom desempenho analítico, incluindo eficiência, seletividade e aplicabilidade para determinações simultâneas (MAMANI, 2007).

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica poderosa e amplamente empregada para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001), podendo concentrar traços de analitos e remover compostos interferentes simultaneamente. Se não ocorrerem perdas durante o processo, quanto maior a relação entre o volume de amostra e o volume de eluição, maior será o fator de pré-concentração obtido (PUIG et al., 2007).

Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos juntamente com os compostos interferentes após passarem por um sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para eluir os analitos de interesse (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

A utilização da SPE diminui o tempo de análise e o consumo de solventes, não forma emulsões, promove a pré-concentração dos analitos e apresenta alto potencial para automatização (NETO; SIQUEIRA, 2005), quando comparada à extração líquido-líquido (AZODI-DEILAMI; ABDOUSS; HASANI, 2010).

A SPE é tradicionalmente usada na forma de cartuchos (NETO; SIQUEIRA, 2005). Os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna, sendo que um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Porém, com a passagem de grandes volumes de amostra, os cartuchos podem ser obstruídos (*channeling*), tornando o processo lento (NETO; SIQUEIRA, 2005). Entre outras desvantagens, pode-se citar também: a heterogeneidade de partículas de sorvente entre diferentes lotes e fabricantes, a reversibilidade incompleta da sorção de alguns analitos dos sítios ativos dos sorventes, o que diminui a recuperação esperada, e a possibilidade de ocorrer contaminação dos analitos isolados por impurezas originadas dos processos de fabricação e empacotamento (POOLE et al., 1997).

O segundo formato de SPE mais utilizado depois do cartucho é o disco (ou membrana carregada de partícula). Neste tipo de extração, as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

No que diz respeito a fluxo de amostra, os discos extratores em fase sólida admitem fluxos mais altos, o que diminui o tempo de extração, além de permitir a passagem de maior volume de líquido e, assim, maior concentração dos analitos (NETO; SIQUEIRA, 2005).

A extração em discos foi originalmente introduzida para extração de traços de materiais orgânicos em água. Um disco típico, 47 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, contém 500 mg de sorvente, por exemplo, partículas de C<sub>8</sub> ou C<sub>18</sub>, de 8 µm de diâmetro de partícula e 6 nm de poro, imobilizadas no suporte. O diâmetro do disco é escolhido de acordo com o volume de amostra e são disponíveis numa faixa de 4 a 90 mm (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A SPE em discos C<sub>18</sub> fornece resultados adequados utilizando, na extração, volumes de água em torno de 1 litro. A utilização de volumes maiores pode diminuir a recuperação (NETO; SIQUEIRA, 2005).

O processo de extração pode ser realizado de duas maneiras. A mais comum é empregar o mesmo equipamento utilizado em HPLC para filtração de solventes e passar a amostra através do disco sob vácuo; os analitos são retidos e removidos com um volume adequado de solvente. Outra opção é suspender o disco na amostra líquida, por um período de tempo controlado; em seguida, ele é seco e os analitos são desorvidos em outro solvente apropriado (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Via de regra, a quantidade mínima de solvente necessária para eluir um disco de SPE é de aproximadamente 10 µL/ mg de sorvente; portanto, para eluir um disco padrão de 500 mg com 47 mm de diâmetro serão necessários 5 mL de solvente (THURMAN; SNAVELY, 2000).

A área de superfície aumentada e a redução de *plugging* são considerações importantes para se definir o melhor formato de extração quando se trabalha com grandes volumes de amostra com partículas suspensas, como amostras de água do meio ambiente; em se tratando de amostras pequenas, como as aplicações farmacêuticas comuns, a otimização da quantidade de sorvente se torna importante para reduzir a adsorção não específica da matriz (POOLE et al., 1997).

Os discos possuem uma série de vantagens devido ao seu formato, tais como leito mais homogêneo, pressões menores durante a aplicação da amostra e na eluição, ausência de caminhos preferenciais, melhor repetibilidade e reprodutibilidade, vazões mais altas e menores volumes de eluentes para a desorção. O melhor desempenho dos discos é devido ao tamanho menor da partícula, que proporciona uma transferência de massa mais rápida (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Tanto os cartuchos como os discos podem ser usados no campo e armazenados para posterior análise no laboratório, o que torna esta técnica muito útil para trabalhos neste local, onde o acesso e o transporte muitas vezes dificultam a análise em tempo hábil (NETO; SIQUEIRA, 2005).

Atualmente, vários sorventes estão disponíveis comercialmente. Em geral, os materiais de recheio empregados para SPE são similares aos usados em cromatografia líquida – carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas e polímeros, por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno. Porém, avanços recentes em SPE têm sido direcionados para a síntese de sorventes mais seletivos, como polímeros impressos molecularmente (MIP). As etapas de extração, concentração e isolamento são possíveis em um único passo (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

## 2.4 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

A impressão molecular é uma técnica atrativa para a síntese de receptores poliméricos seletivos, que apresentam sítios de reconhecimento artificialmente gerados capazes de se ligar especificamente à molécula-alvo em preferência a outros compostos semelhantes (AZODI-DEILAMI; ABDOUSS; HASANI, 2010).

Sorventes altamente seletivos para um grande número de analitos de interesse ambiental e farmacêutico podem ser preparados por impressão molecular (SELLERGREN; LANZA, 2003).

Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos. Estes sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor das moléculas do analito. Assim são formados complexos, através de interação molecular, entre o analito e o monômero precursor. Os complexos são fixados por meio de reações de entrecruzamento de polímeros. A remoção do analito da matriz polimérica forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

O comportamento dos MIPs simula as interações estabelecidas entre receptores naturais ao reterem seletivamente a molécula-alvo, como por exemplo, anticorpo-antígeno. Na última década, uma das aplicações técnicas mais promissoras, baseada na utilização de MIPs,

vem sendo a extração em fase sólida impressa molecularmente (MISPE). Além disso, a síntese dos MIPs é relativamente barata e fácil (AZODI-DEILAMI; ABDOUSS; HASANI, 2010).

Em MISPE, as condições de lavagem e eluição precisam ser cuidadosamente otimizadas em relação a pH, força iônica e natureza do solvente, com o objetivo de explorar da melhor maneira a habilidade do MIP de reconhecer a molécula modelo. Uma vez que a extração seletiva foi alcançada, o analito precisa ser eficientemente dessorvido no menor volume possível para se obter maior enriquecimento e alta recuperação do analito purificado (SELLERGREIN; LANZA, 2003).

O uso de MIP para extração em fase sólida pode ocorrer de várias maneiras, incluindo a SPE convencional, onde o MIP é colocado dentro de colunas ou cartuchos e o modo *batch*, em que o MIP é incubado com a amostra. Outra grande vantagem da extração em fase sólida associada ao MIP, em relação à elevada seletividade do sorvente, é o alcance de uma purificação eficiente da amostra (AZODI-DEILAMI; ABDOUSS; HASANI, 2010).

A maioria dos MIPs relatados é preparada por polimerização em *bulk* (JING et al., 2007). Nessa metodologia de síntese, a molécula modelo (MM) e o monômero funcional (MF) são dissolvidos em um solvente apropriado e se ligam estrategicamente em posições específicas e complementares. Posteriormente, adiciona-se o agente de ligação cruzada (ALC) responsável pela interligação entre as moléculas de MF, o que resulta na formação de uma rede polimérica, e o iniciador radicalar (IR), com a função de gerar radicais reativos para iniciar e sustentar a reação de polimerização. Com relação à constituição física dos MIPs, salienta-se que a síntese por *bulk* resulta em polímeros de consistência rígida e heterogênea, sendo necessário realizar a moagem e o peneiramento do mesmo antes do uso (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

Outras estratégias de polimerização têm sido propostas com o objetivo de superar as limitações da técnica de polimerização em “bulk” (JING et al., 2007), como a obtenção de partículas de formato e tamanho variados durante a trituração, e a destruição parcial de alguns sítios seletivos durante o mesmo processo, que diminuem a capacidade seletiva de retenção do polímero (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005), entre elas, polimerização por suspensão, polimerização sobre superfície de sílica modificada e polimerização por precipitação.

Na polimerização por suspensão, a reação ocorre dentro de gotas do monômero dispersas num solvente imiscível, geralmente água, na presença de um agente estabilizador, cuja função é evitar a coagulação das gotas de monômero durante o processo. Esta técnica

geralmente é bem sucedida quando as interações entre analito e monômero são preferencialmente hidrofóbicas e iônicas (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Na polimerização sobre superfície de sílica modificada, partículas de sílica são inicialmente modificadas com tri-etoxi-aminopropilsilano. A reação de polimerização tem início com a adição do iniciador radicalar. Em seguida, são adicionados o monômero, o reagente de ligação cruzada e o analito, já dissolvidos no solvente. A reação ocorre sobre a superfície da sílica, formando uma fina camada polimérica. As micropartículas obtidas são uniformes e mecanicamente estáveis (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A síntese por precipitação é semelhante ao processo em “bulk”, exceto pela maior quantidade de solvente (geralmente cinco vezes mais) utilizada para dissolver os demais reagentes (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008). A formação de partículas poliméricas ocorre devido ao crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação tornando o polímero menos solúvel no meio. Outra explicação para a precipitação pode ser a formação de ligações cruzadas no polímero, tornando-o pouco solúvel no meio de síntese (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A escolha do solvente de síntese é de grande importância no preparo dos MIPs, sendo necessário atender três pontos básicos. Inicialmente, o solvente deve solubilizar molécula-modelo, monômero funcional, agente de ligação cruzada e iniciador radicalar. Além disso, os solventes devem ser capazes de gerar grandes poros, garantindo que o polímero resultante tenha boa capacidade de adsorção. Como última característica, o solvente deve apresentar relativamente baixa polaridade, diminuindo interferências entre a molécula impressa e o monômero durante a síntese (SUN et al., 2009).

O potencial deste tipo de material é alto, uma vez que oferece resistência mecânica as altas temperatura e pressão, além de ser inerte frente a condições extremas decorrentes da presença de ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos. Estas características são altamente favoráveis para serem utilizadas em análises de rotina (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

No caso específico das tetraciclinas, devido a sua capacidade de formarem complexos com metais, interações irreversíveis entre os analitos e íons metálicos residuais presentes nos sorventes de extração em fase sólida à base de sílica modificada com grupos alquila  $C_8$  e  $C_{18}$ , podem levar a valores baixos de recuperação. Com o objetivo de minimizar este problema, foram relatadas alternativas como a adição de agentes quelantes (EDTA dissódico ou ácido cítrico) às amostras ou a utilização de material polimérico como sorvente (HERNANDEZ; SANCHO; GUERRERO, 2007; SILVA; COLLINS, 2011).

A maior parte dos protocolos de impressão molecular produz polímeros que apresentam melhor desempenho em meios com solventes orgânicos do que em sistemas puramente aquosos. Tal situação decorre da possível formação de ligações hidrofóbicas inespecíficas entre a molécula-modelo e a superfície do material, que precisam ser reduzidas para utilização de MIPs em meios aquosos (PUOCI et al., 2009).

Buscando reduzir estas interações inespecíficas na superfície do MIP, diferentes metodologias vêm sendo propostas. Uma delas sugere a adição de um monômero hidrofílico, como o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), durante a síntese; sabe-se que este composto proporciona ao material maior compatibilidade com sistemas aquosos, além de ser capaz de interferir na formação do complexo pré-polimerização com vários analitos através da formação de pontes de hidrogênio. Outra alternativa sugere a modificação hidrofílica da superfície do MIP utilizando glicerol monometacrilato (GMMA) e glicerol dimetacrilato (GDMA); estes materiais evitam a deposição de macromoléculas na superfície polimérica, aumentando o reconhecimento molecular impresso (PUOCI et al., 2009).

Este tipo de material tem se mostrado eficaz na remoção de interferentes em análises de amostras de água do meio ambiente.

Em 2005, Watabe et al. sintetizaram um polímero para análise de bisfenol A em amostras de água e empregaram os monômeros hidrofílicos GDMA e GMMA no revestimento superficial do MIP. O polímero superficialmente revestido apresentou maior capacidade de remover interferentes do que o material sem revestimento (WATABE et al., 2005).

Em um estudo para determinação de antiepilépticos em água, os autores verificaram que o material com revestimento hidrofílico superficial, empregando-se GMMA e GDMA, apresentou maior seletividade que o não revestido (HOSHINA et al., 2009).

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, os autores determinaram simetrina, ametrina e prometrina em água de rio através de um sistema de *switching column* acoplado ao HPLC com detecção UV. Foram avaliados polímeros de irgarol com revestimento hidrofílico superficial e não revestidos. O material com revestimento de superfície mostrou efetivamente sua capacidade de remover interferentes das amostras de água. Além disso, ambos os materiais mostraram durabilidade frente a sucessivas injeções de amostra (SAMBE; HOSHINA; HAGINAKA, 2007).

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um disco de extração em fase sólida utilizando polímero impresso molecularmente com revestimento superficial hidrofílico como sorvente para a extração seletiva e pré-concentração de antibióticos da classe das tetraciclina em amostras ambientais (águas superficiais) seguido da análise por cromatografia líquida com detecção ultravioleta (HPLC-UV).

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese do disco de extração molecularmente impresso;
- Avaliação da seletividade do MIP;
- Avaliação do MIP como sorvente para a extração em fase sólida em disco;
- Avaliação da capacidade de pré-concentração do sistema de MISPE;
- Desenvolvimento de método de análise de resíduos de tetraciclina em amostras ambientais por HPLC-UV;
- Otimização das condições de extração e análise;
- Validação do método de análise HPLC-UV;
- Aplicação em amostras de água de represas e rios.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os padrões cloridrato de oxitetraciclina (95%), cloridrato de tetraciclina (97,5%), cloridrato de clortetraciclina (93%) e hclato de doxiciclina (98,2%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Soluções-estoque de cada um dos padrões na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em metanol e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração (2 – 8 °C), para posterior diluição no momento do uso.

Os solventes metanol, acetonitrila e álcool etílico (grau HPLC) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); a acetona (grau HPLC) foi obtida da Honeywell (Muskegon, Estados Unidos).

Ácido clorídrico e hidróxido de sódio também foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e o ácido oxálico foi comprado da QEEL (São Paulo, Brasil).

Os reagentes ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2,2'-azo-bis-isobutironitrila, 2-hidroxietil metacrilato e glicerol dimetacrilato – utilizados na síntese dos polímeros – foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

A água deionizada utilizada nos experimentos foi obtida através de um sistema de purificação Millipore (São Paulo, Brasil).

Os demais equipamentos utilizados foram: balança analítica Kern (Balingen, Alemanha), banho de ultrassom Unique (Indaiatuba, Brasil), banho de água Novatecnica (Piracicaba, Brasil), pHmetro Tecnoyon (Piracicaba, Brasil) e agitador magnético com aquecimento Novatecnica (Piracicaba, Brasil).

As análises foram efetuadas utilizando-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Tóquio, Japão) com bomba LC-AT vp e injetor automático SIL-10 AF, acoplado a detector de arranjo de diodos SPD-M10A vp (HPLC-DAD), em comprimento de onda de 355 nm. Empregou-se coluna BDS Hypersil C<sub>18</sub> Thermo (West Palm Beach, Estados Unidos) (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna similar (4 mm x 4,6 mm), com temperatura do forno a 35 °C.

## 4.2 SÍNTESE DOS POLÍMEROS

Foram sintetizados quatro materiais diferentes, sendo duas versões impressas – uma com revestimento superficial (MIP-1) e outra não revestida (MIP-2) – e duas versões não impressas correspondentes, NIP-1 e NIP-2. O método de síntese empregado foi a polimerização por precipitação.

Para síntese do MIP-1, num primeiro momento, 1 mmol de oxitetraciclina (molécula-modelo) foi dissolvido aos poucos em 24 mL de metanol com o auxílio de um bastão de vidro em um béquer de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 3 mmol de ácido metacrílico (MAA) como monômero funcional, 25 mg de 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) como iniciador radicalar e 7 mmol de etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) como agente de ligação cruzada. Transferiu-se a mistura para um balão de três bocas de 100 mL, que foi então colocado em banho de ultrassom por 10 minutos e, posteriormente, mantido sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos, para que fosse criada uma atmosfera livre de oxigênio. Este sistema foi colocado em banho de glicerina a 60 °C sob refluxo por 1 hora.

Numa segunda etapa, 7,5 mmol de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e 0,5 mmol de glicerol dimetacrilato (GDMA) foram solubilizados em 24 mL de metanol em um béquer de 100 mL. Esta mistura foi colocada sob fluxo de nitrogênio por 20 minutos e transferida para o balão de síntese ao final da primeira etapa (após uma hora). O sistema foi mantido a 60 °C sob refluxo por mais 23 horas.

A síntese do MIP-2 seguiu o mesmo modelo do MIP-1, exceto pela ausência da segunda etapa. Como MIP-2 não apresenta o revestimento superficial, a síntese segue por 24 horas sem a adição dos comonômeros hidrofílicos HEMA e GDMA. As versões não impressas dos polímeros (NIP-1 e NIP-2) foram sintetizadas da mesma forma que os polímeros impressos, porém sem a molécula-modelo.

Os polímeros resultantes passaram por uma pré-lavagem em funil de Büchner com metanol (cinco alíquotas de 100 mL) até desaparecer completamente a coloração amarela característica da oxitetraciclina (molécula-modelo) no caso das versões impressas, MIP-1 e MIP-2. Antes de serem utilizados como sorvente, estes materiais passaram novamente por uma etapa de lavagem com 200 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 100 mL de metanol, 100 mL de acetona e 500 mL de água destilada. Os materiais foram secos em estufa a 45 °C por 24 horas. Depois de secos, os polímeros foram tamisados e foram selecionadas partículas menores que 106 µm.

Finalizadas as etapas de lavagem, amostras de água isentas dos analitos de interesse foram percoladas pelos polímeros, tendo os eluatos analisados por HPLC para verificação da eficiência do procedimento de remoção da molécula-modelo.

Como os polímeros não impressos são sintetizados sem a molécula-modelo, estes materiais passaram por um processo mais simples de lavagem, apenas com etanol, metanol e água (50 mL de cada solvente). Os eluatos também foram analisados em cromatógrafo líquido de alta performance com detecção ultravioleta.

A Figura 2 apresenta o desenho esquemático do processo de síntese dos polímeros.

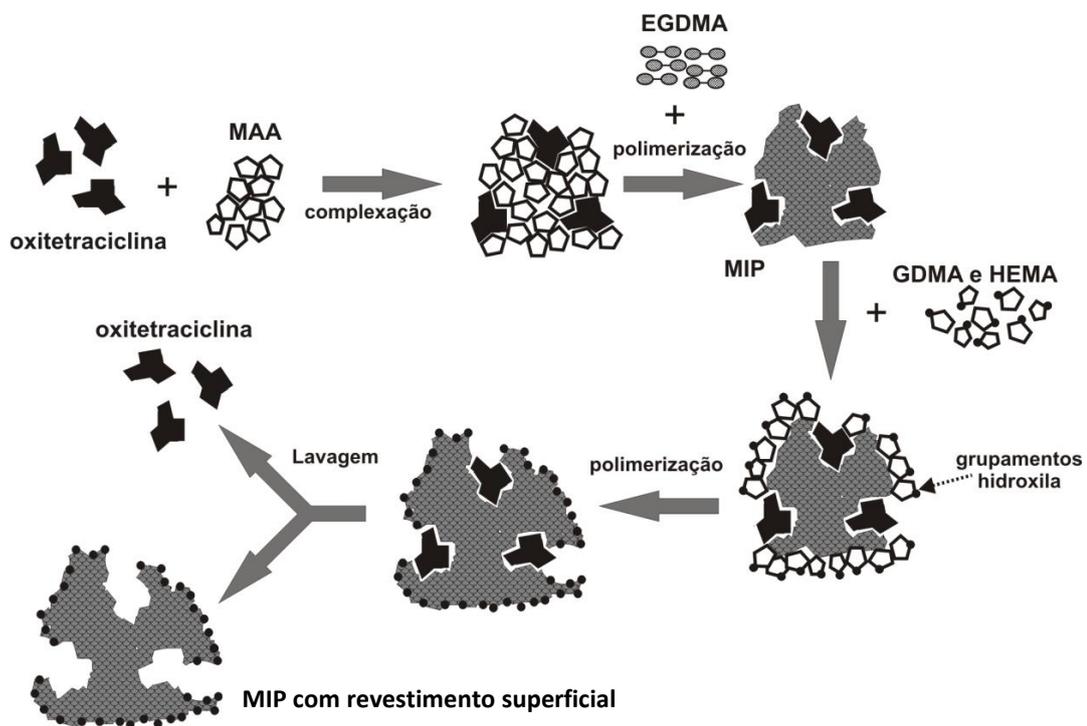


Figura 2 – Esquema de síntese dos polímeros.

A capacidade adsortiva dos quatro materiais foi avaliada através de testes comparativos de extração. Amostras de água fortificadas com os padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  foram extraídas utilizando-se os polímeros MIP-1, MIP-2, NIP-1 e NIP-2 como sorventes, na sequência: branco, amostra em triplicata e branco.

### 4.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM DISCO (SPE)

O sistema de extração foi montado sobrepondo-se uma placa de politetrafluoretileno perfurada com um papel de filtro de  $0,45\ \mu\text{m}$ , seguido de um anel de 40 mm de diâmetro interno por 2 mm de espessura. O interior desse anel foi preenchido com 1 g de MIP-1 homogeneamente distribuído. Em seguida, o anel foi recoberto com outro papel de filtro e mais uma placa perfurada, conforme demonstrado na Figura 3 (à esquerda).

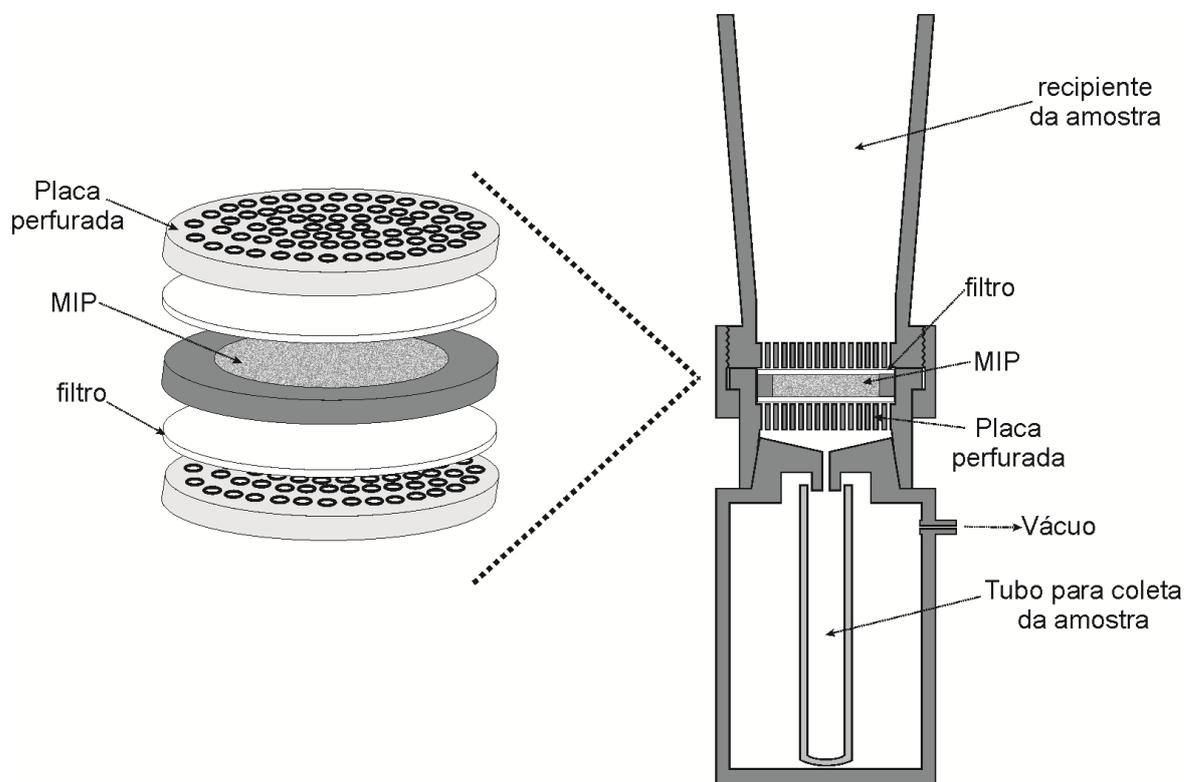


Figura 3 – Desenho esquemático do sistema de extração em disco.

Para acondicionar o polímero no interior do anel, o material foi suspenso em uma pequena quantidade de água destilada. Então, esta suspensão foi vertida no compartimento de amostra e, na presença de vácuo, a água passou pelo sistema enquanto o polímero ficou retido sobre o papel de filtro. Depois de verificar se o polímero estava uniformemente distribuído, outro papel de filtro e outra placa perfurada foram colocados na parte de cima, estando o sistema pronto para o procedimento de extração.

O condicionamento do polímero foi realizado com 20 mL de fase móvel composta por acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> – 20:80 v/v), seguidos por 20 mL de água destilada. Na sequência, percolou-se a amostra e finalizou-se o procedimento com a eluição (5 mL de acetona). O volume eluído foi recolhido em béquer afunilado, onde foi seco em banho de água a 50 °C sob fluxo de N<sub>2</sub>. Finalizada a etapa de secagem, os analitos foram ressuspensos em 500 µL da fase móvel citada acima através de agitação em vortex por um minuto. Após a ressuspensão, 200 µL da solução foram transferidos para *vials* de plástico e levados para injeção cromatográfica, sendo 150 µL o volume de injeção.

As extrações empregando-se os outros materiais – MIP-2, NIP-1 e NIP-2 – foram realizadas nas mesmas condições.

#### 4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas apresentam um sistema gradiente de eluição, conforme mostra a Tabela 1.

Tempo (minutos)	Fase Móvel	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )
0 – 3	A <sup>a</sup>	1
3,01 – 13	B <sup>b</sup>	1,6
13,01 – 15	A <sup>a</sup>	1,6

<sup>a</sup>Acetonitrila:Ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (20:80);

<sup>b</sup>Acetonitrila:Ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (25:75).

As análises foram realizadas empregando-se detector ultravioleta em comprimento de onda de 355 nm. O volume de injeção foi de 150 µL.

#### 4.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

O método desenvolvido foi validado com base nos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade das amostras.

A linearidade é a capacidade de o método analítico obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em um determinado intervalo de

concentrações. Para este teste, amostras de água foram fortificadas nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  com os quatro analitos – OTC, TC, CTC e DOX.

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra, podendo ser determinada na mesma corrida (curto intervalo de tempo, mesmo analista e mesmo equipamento), em corridas diferentes (dias, analistas e equipamentos diferentes) ou ainda entre laboratórios diferentes.

Para este método, a precisão foi avaliada de duas maneiras – dentro da mesma corrida (precisão intra-corrída ou repetibilidade) e em corridas analíticas diferentes (precisão inter-corrídas ou intermediária) – considerando-se dois pontos do intervalo linear (10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

A exatidão, por sua vez, é a proximidade dos resultados obtidos com o método em questão em relação ao valor real. Ela pode ser expressa como recuperação ou erro relativo e, foi realizada considerando-se os mesmos dois pontos do intervalo linear avaliados na precisão (10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Para os testes de precisão e exatidão, amostras de água foram fortificadas nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  com os quatro analitos – OTC, TC, CTC e DOX.

O limite de quantificação foi calculado como sendo a concentração correspondente a um sinal dez vezes maior que o ruído da linha de base, enquanto o limite de detecção foi estimado como sendo a concentração que gerou um sinal três vezes maior que o mesmo ruído.

Para determinação do tempo de espera entre coleta da amostra no meio ambiente e análise da mesma no laboratório, realizou-se também um teste de estabilidade dos analitos em água por um período total de sete dias. Amostras de água foram fortificadas nas concentrações de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  com os quatro analitos – OTC, TC, CTC e DOX – e armazenadas em frascos âmbar à temperatura de refrigeração (2 a 8 °C). As análises foram realizadas nos tempos zero, quatro e sete dias, em triplicata.

#### 4.6 AMOSTRAS

Para aplicação do método desenvolvido, foram coletadas cinco amostras de 1 litro de água de pontos diferentes da represa de Furnas na região de Alfenas – MG.

As amostras foram coletadas em frascos âmbar e transportadas para o laboratório, onde foram analisadas no mesmo dia. Antes do início da análise, as amostras tiveram o pH ajustado para 5 com HCl 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  e foram filtradas em papel de filtro 0,45  $\mu\text{m}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPARAÇÃO ENTRE MIP-1, MIP-2, NIP-1 E NIP-2 NA EXTRAÇÃO DE TETRACICLINAS

Para que a capacidade adsortiva dos polímeros MIP-1, MIP-2, NIP-1 e NIP-2 pudesse ser avaliada, amostras de água contendo os analitos OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  foram percoladas pelos diferentes materiais.

Para a extração, os polímeros foram condicionados com 30 mL de fase móvel (metanol:acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  – 10:17:73 v/v/v), seguidos por 20 mL de água. O volume de amostra foi de 100 mL e a eluição foi realizada com 5 mL da mesma fase móvel citada acima. Destes 5 mL, 1 mL foi transferido para um *vial* e o volume de injeção no HPLC foi de  $50 \mu\text{L}$ .

Os resultados do teste de adsorção podem ser vistos na Figura 4.

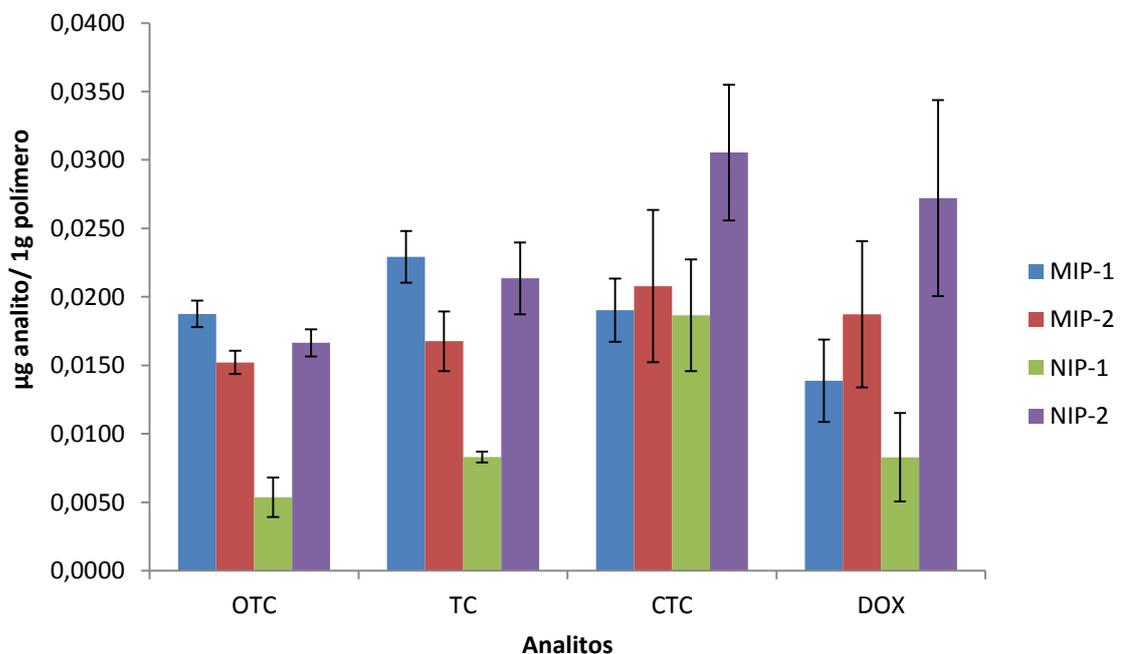


Figura 4 – Comparação da capacidade adsortiva de MIP-1, MIP-2, NIP-1 e NIP-2 realizada com amostras de água adicionadas de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Comparando-se, inicialmente, os polímeros MIP-1 e MIP-2, OTC e TC foram mais adsorvidas no disco de MIP-1. Esse fato pode ser explicado pela presença dos grupamentos hidrofílicos na superfície do MIP-1 – decorrente do emprego de HEMA e GDMA na síntese – tornando o material mais compatível com sistemas aquosos. Uma vez que há predomínio de interações de hidrogênio entre a água e as hidroxilas superficiais, a perturbação desse solvente na ligação analito – polímero é menor, levando ao aumento da capacidade adsortiva de MIP-1.

Por outro lado, quando a comparação ocorre entre as versões não impressas dos dois materiais, é possível verificar que o NIP-2 apresenta maior adsorção do que o NIP-1 para os quatro analitos. Como possível explicação, a maior adsorção ao NIP-2 provavelmente se deve a interações não específicas de superfície, já que o mesmo não apresenta os comonômeros hidrofílicos HEMA e GDMA em sua composição. Assim, a superfície é mais desprotegida, permitindo interações não específicas. Quando a superfície é revestida com HEMA e GDMA, ocorre uma diminuição das interações não específicas e, conseqüentemente, uma menor adsorção.

Finalmente, comparando-se MIP-1 e NIP-1, a versão impressa (MIP-1) apresentou maior capacidade de adsorção do que a não impressa (NIP-1) para OTC, TC, CTC e DOX, mostrando que a presença de sítios seletivos, obtidos com o emprego da molécula-modelo OTC durante a síntese do material impresso, aumenta a capacidade adsortiva do polímero.

Sendo assim, concluiu-se também que todas as moléculas apresentaram retenção satisfatória no MIP, atestando a similaridade química da TC, CTC e DOX em comparação à OTC utilizada como molécula- modelo (FIGURA 5). Tal comportamento é vantajoso no sentido de que favorece a extração ou pré-concentração simultânea de todas as substâncias em detrimento a potenciais interferentes. Nesse contexto, acredita-se que as tetraciclinas interagem com o sítio seletivo do polímero principalmente por meio dos ligantes do anel A que notadamente é o mesmo em todas as moléculas. Além disso, as pequenas variações intermoleculares decorrentes da presença ou ausência de hidroxilas não influenciam drasticamente a adsorção ao MIP.

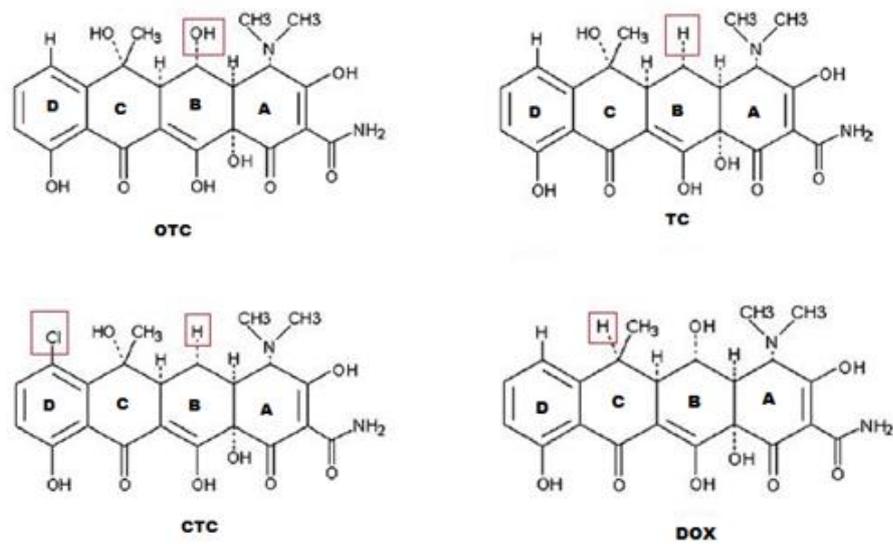


Figura 5 – Estrutura geral das tetraciclinas.

Fonte: SUN et al. (2009).

Diante dos bons resultados obtidos para o MIP-1, relacionados com o revestimento hidrofílico, este polímero foi selecionado como sorvente para o procedimento de SPE em disco. O mesmo material foi empregado em todos os experimentos, desde a etapa de otimização até a aplicação.

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

As variáveis selecionadas para a etapa de otimização foram pH da amostra, volume de amostra utilizado na extração, condicionamento do disco (volume de fase móvel), natureza do solvente empregado na eluição, volume de ressuspensão e volume de injeção.

As condições de partida do experimento foram: amostra sem ajuste de pH, volume de 100 mL, condicionamento do disco com 30 mL de fase móvel e eluição também com fase móvel (5 mL), volume de ressuspensão de 500  $\mu$ L e volume de injeção de 50  $\mu$ L.

### 5.2.1 pH da amostra

O pH é um parâmetro crítico quando se trabalha com poluentes orgânicos emergentes, principalmente quando se trata de fármacos, uma vez que este parâmetro determina a forma química do analito em solução, interferindo portanto na eficiência da extração (SILVA; COLLINS, 2011).

Amostras de água fortificadas com os padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  foram avaliadas em relação ao melhor pH de extração na faixa de 1 a 11. As extrações foram realizadas em triplicata e o ajuste do pH foi feito com HCl 10% ou hidróxido de sódio (NaOH)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados estão apresentados na Figura 6.

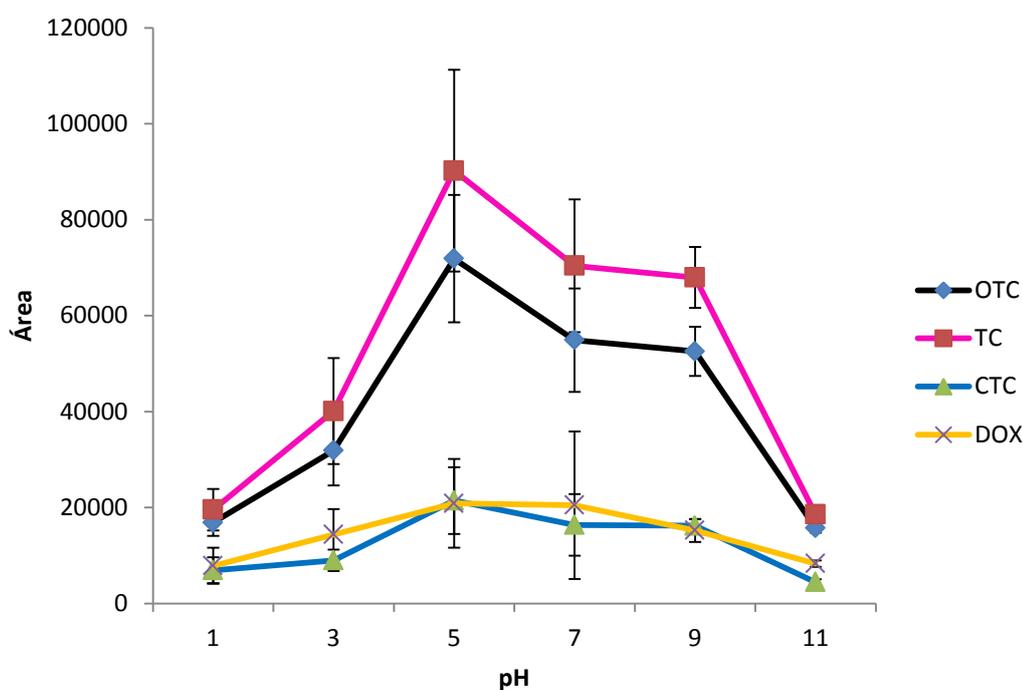


Figura 6 – Influência do pH na resposta analítica empregando-se amostra fortificada com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Na Figura 7 podem ser observados os sítios de ionização na estrutura das tetraciclina. O grupamento que confere o pKa em torno de 3 é o grupo hidroxila do anel A; a segunda dissociação (pKa de aproximadamente 7) deve-se ao sistema dicarbonila entre os anéis B e C; o pKa em torno de 9 é característico da terceira dissociação – a perda de um próton do grupo dietilamino no anel A e, a última ionização ocorre no grupamento fenol do anel D (8).

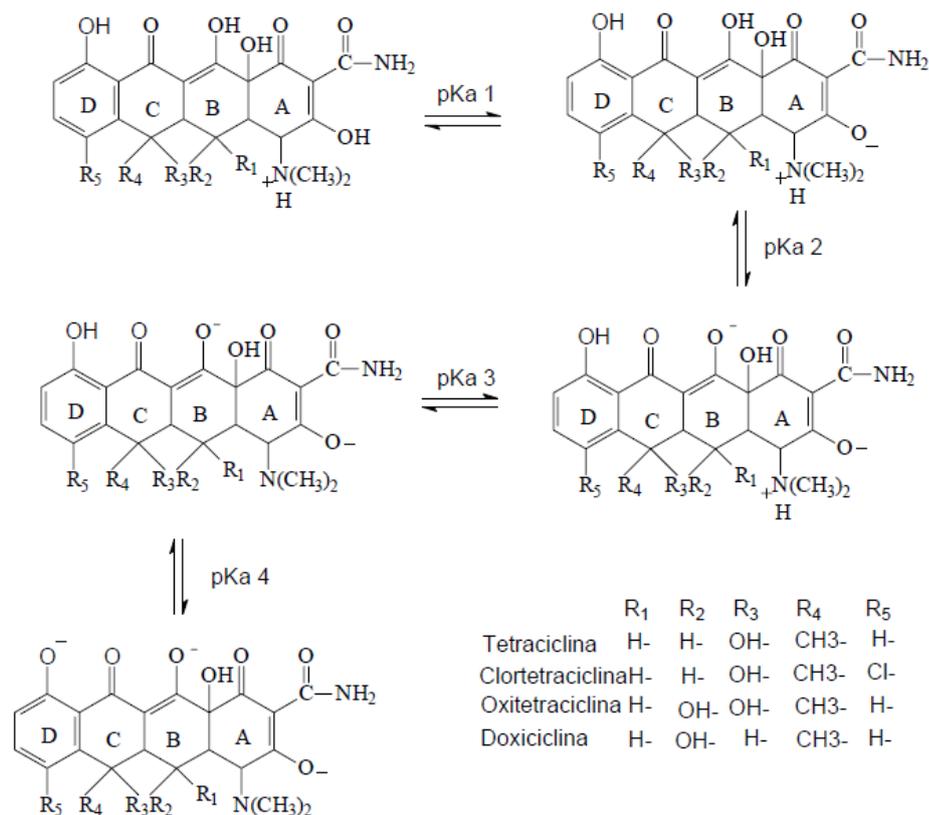


Figura 7 – Sítios de ionização das tetraciclina.

Fonte: MAMANI (2007).

Analisando-se os sítios de ionização das tetraciclina na Figura 7 e seus respectivos valores de pKa na Tabela 2, tem-se que o único grupamento básico é referente à terceira dissociação (pKa 9), sendo os demais ácidos.

Tabela 2 – Valores de pKa das tetraciclina

Analitos	pKa			
	pKa 1 <sup>a</sup>	pKa 2 <sup>a</sup>	pKa 3 <sup>b</sup>	pKa 4 <sup>a</sup>
OTC	3,6	7,5	9,4	10,5
TC	3,4	7,4	9,6	12,1
CTC	3,6	7,5	9,9	10,4
DOX	3,6	7,5	9,4	12,1

Fonte: MAMANI (2007) - adaptado.

<sup>a</sup>Ácido; <sup>b</sup>básico.

A Tabela 3 mostra o possível estado de ionização de cada grupamento das tetraciclina, bem como da carboxila terminal do MAA (pKa = 4,6) (LIDE, 2004) em algumas faixas de pH avaliadas.

Tabela 3 – Estado de ionização dos grupamentos ionizáveis das tetraciclinas e do MF em algumas faixas de pH

Grupamentos	Condição			
	pH ≤ 3,0	pH = 5,0	7,5 < pH < 9,4	9,4 < pH < 10,5
Fenol (anel A)	NI <sup>a</sup>	I (-)	I (-)	I (-)
Dicarbonila (anéis B e C)	NI	NI	I (-)	I (-)
Dietilamino (anel A)	I <sup>b</sup> (+)	I (+)	I (+)	NI
Fenol (anel D)	NI	NI	NI	NI
Carboxila do MF	NI	I (-)	I (-)	I (-)

<sup>a</sup>Não ionizado; <sup>b</sup>ionizado.

Como pode ser observado na referida Tabela, em pH 5,0, o grupamento carboxila do monômero funcional encontra-se ionizado negativamente (desprotonado), enquanto que o grupamento dietilamino da tetraciclina encontra-se ionizado positivamente. Sendo assim, pode-se supor que há uma interação eletrostática entre ambos os grupamentos, o que justifica a maior adsorção neste pH. Com a protonação do grupamento carboxila do MAA em pHs menores que 3,0 e com a desprotonação do grupamento dietilamino das TC em pHs maiores que 9,0, a adsorção foi nitidamente menor em virtude da inexistência da interação eletrostática.

Além disso, é evidente que o ajuste do pH tem influência direta na seletividade do polímero, uma vez que houve uma adsorção maior de OTC e TC (em relação a CTC e DOX) em pH 5,0. Provavelmente, em pHs menores que 3 e maiores que 7, a inexistência da interação eletrostática diminui a proporção de interações seletivas, favorecendo interações de natureza superficial.

Diante de tal discussão, optou-se por trabalhar com a amostra em pH 5, onde ocorreu maior adsorção dos analitos OTC, TC e CTC ao disco MIP-1. Considerando-se o valor de desvio padrão, a maior adsorção de DOX em pH 7, embora sutil, reafirma o comportamento diferente que este analito vem apresentando nos estudos realizados.

A Figura 8 apresenta um cromatograma típico obtido na condição de pH otimizada.

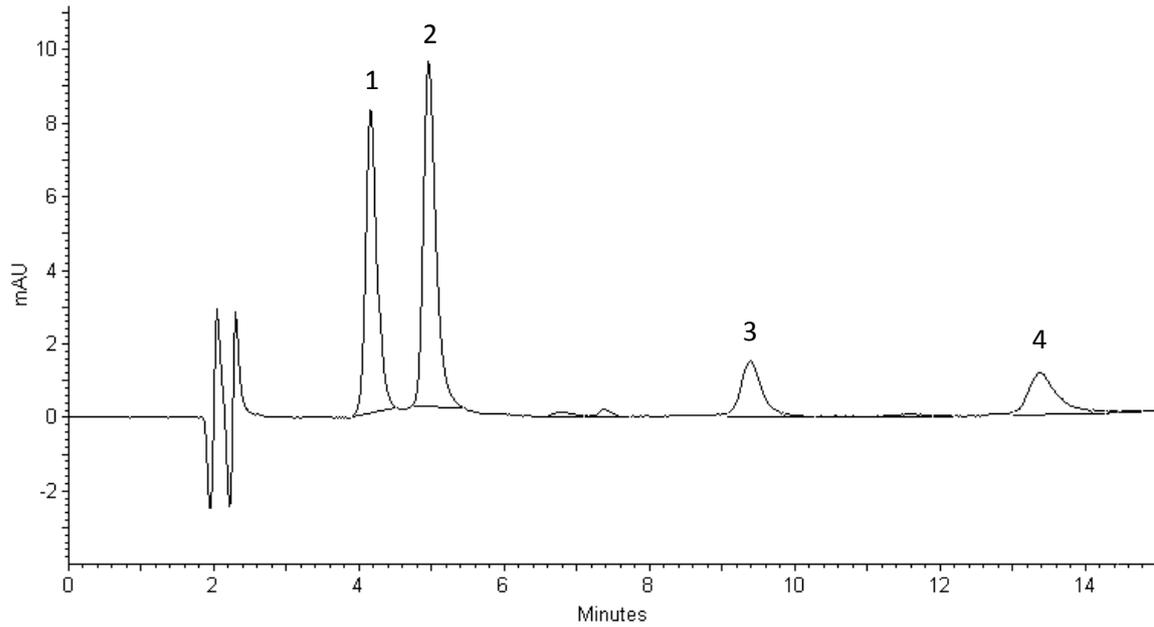


Figura 8 – Cromatograma de amostra de água (pH 5) adicionada de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4), na concentração de 200 µg L<sup>-1</sup>. Extração: MIP-1. Eluição em fase móvel.

### 5.2.2 Volume de extração

As amostras foram fortificadas com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 200 µg L<sup>-1</sup> e determinou-se qual o melhor volume de amostra utilizado na extração. Os volumes estudados foram 25, 50, 100, 200, 250, 300 e 350 mL (FIGURA 9).

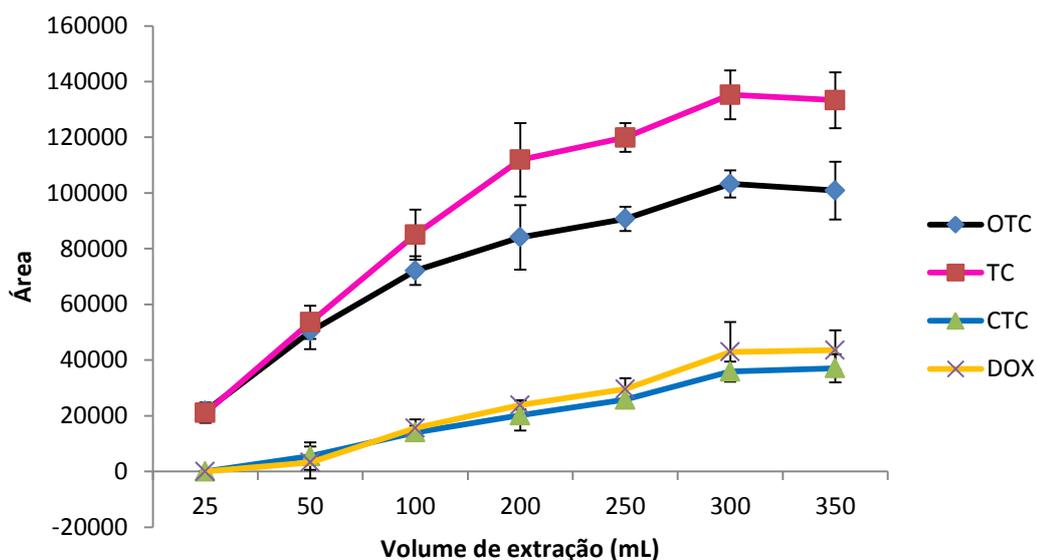


Figura 9 – Influência do volume de extração (amostra) na resposta analítica empregando-se água fortificada com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Os resultados mostraram que o aumento do volume de extração implica em maior adsorção no disco de MIP-1. Esta situação tende ao equilíbrio em certo momento, onde parece ocorrer a saturação dos sítios de ligação do polímero.

Assim, definiu-se como ótimo o volume de extração em que o sistema atinge o equilíbrio, ou seja, 300 mL.

### 5.2.3 Volume de condicionamento do disco

O condicionamento do disco com a fase móvel (acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  – 20:80, v/v) utilizada no método cromatográfico atendeu as necessidades de limpeza entre uma extração e outra. Além disso, a proporção de solvente orgânico (acetonitrila) é baixa em relação ao outro componente da fase (ácido oxálico), estando de acordo com a atual preocupação mundial em torno de práticas mais sustentáveis.

Os volumes de fase móvel testados na etapa de condicionamento foram 10, 20 e 30 mL. A eficiência do condicionamento foi avaliada através da extração de um “branco” entre uma amostra e outra. O volume de 10 mL não foi capaz de limpar completamente o disco, sendo observados sinais de OTC e TC, como pode ser visto na Figura 10.

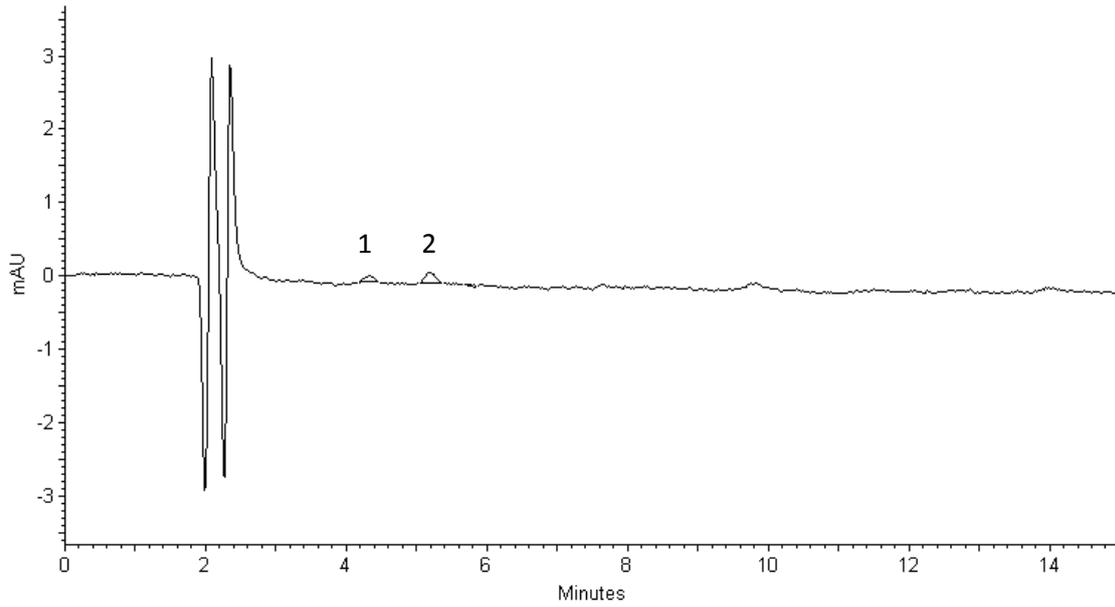


Figura 10 – Cromatograma de amostra de água (pH 5) sem adição dos padrões (“branco”), apresentando sinais de OTC (1) e TC(2). Extração: MIP-1. Eluição: fase móvel. Condicionamento: 10 mL de fase móvel.

Na Figura 11, porém, os sinais dos analitos foram praticamente imperceptíveis quando a lavagem foi feita com 20 mL de fase móvel, sendo esta condição selecionada para os futuros experimentos.

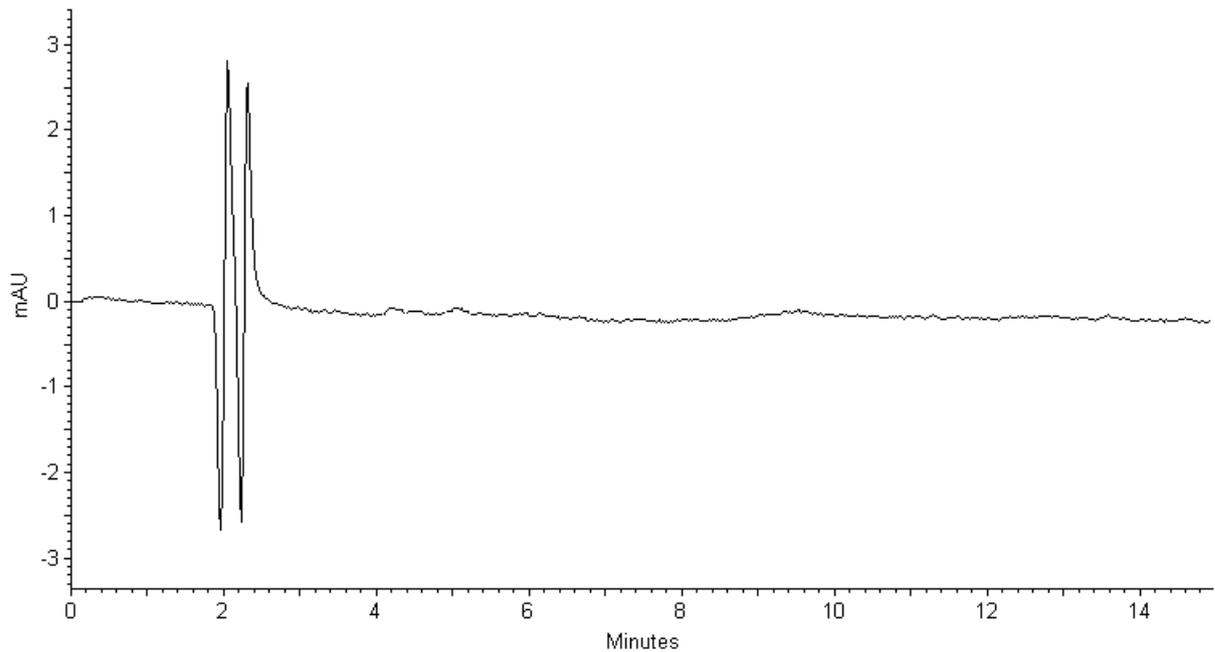


Figura 11 – Cromatograma de amostra de água (pH 5) sem adição dos padrões (“branco”). Extração: MIP-1. Eluição: fase móvel. Condicionamento: 20 mL de fase móvel.

#### 5.2.4 Solvente de eluição

Os resultados da otimização da eluição do analito do disco de MIP-1 confirmaram que esta é uma etapa realmente crítica da extração em fase sólida. Solventes diferentes modificaram completamente o sinal do analito extraído. Os solventes testados foram a própria fase móvel (acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  – 20:80, v/v), metanol, acetona e etanol, no volume de 5 mL.

É válido ressaltar que nesta etapa de eluição, quando se trabalha com solventes voláteis, é possível secar o volume eluído, em banho de água a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  sob fluxo de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e ressuspender o analito na própria fase móvel, para que então seja feita a injeção no sistema cromatográfico. Assim, há um fator de concentração que implica no aumento da sensibilidade.

Ao contrário, quando a eluição é feita na própria fase móvel, não existe a etapa de secagem, ocorrendo injeção direta do que foi eluído; conseqüentemente, não há fator de concentração, resultando, portanto, em menor sensibilidade.

Na Figura 12 podem ser avaliados os resultados da otimização. Nesta etapa, quando metanol, acetona e etanol foram empregados como solvente de eluição, o eluato (5 mL) foi seco e, em seguida, este resíduo foi ressuspense em  $500 \text{ }\mu\text{L}$  de fase móvel, sendo agitado em vortex por um minuto, para posterior injeção no cromatógrafo.

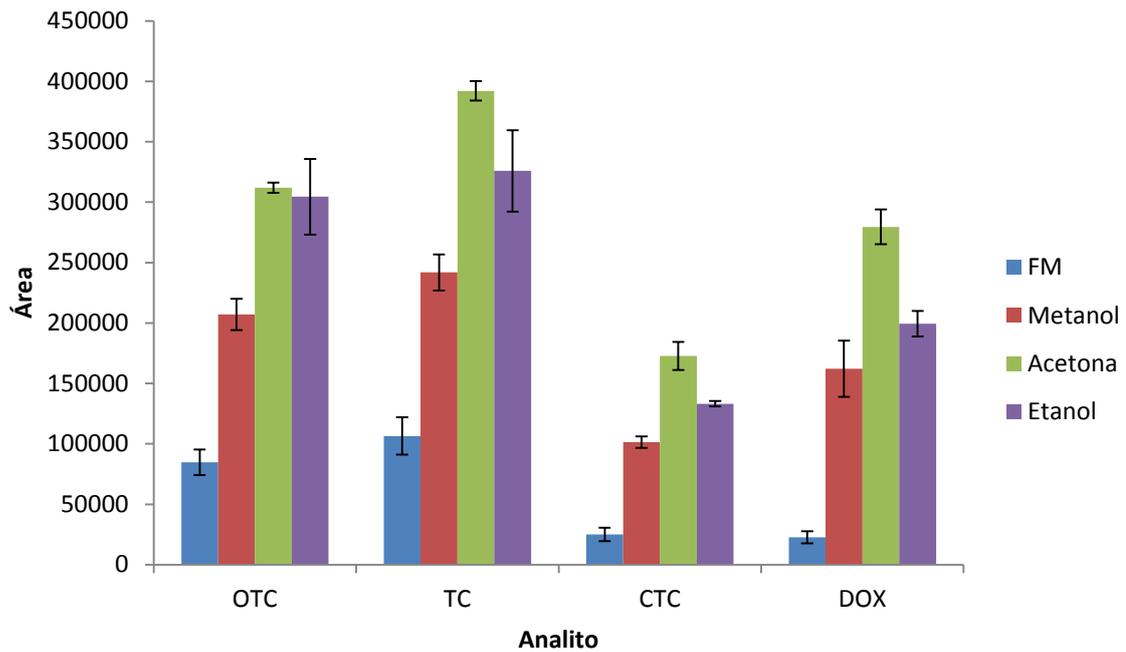


Figura 12 – Influência da natureza do solvente de eluição na resposta analítica empregando-se amostras fortificadas com os padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

É possível observar que a eluição com acetona apresentou maior resposta para os analitos TC, CTC e DOX em relação aos outros eluentes avaliados – fase móvel, metanol e etanol. Considerando-se o desvio padrão entre as medições, o etanol mostrou maior resposta para OTC.

Supõe-se que os melhores resultados obtidos com a acetona como eluente sejam decorrentes da menor viscosidade deste solvente, o que facilita a difusibilidade do mesmo pelo polímero.

Devido à baixa solubilidade dos analitos em solventes não polares, estes não foram avaliados.

Como as melhores respostas foram obtidas para acetona, esse solvente foi selecionado como condição de trabalho (FIGURA 13).

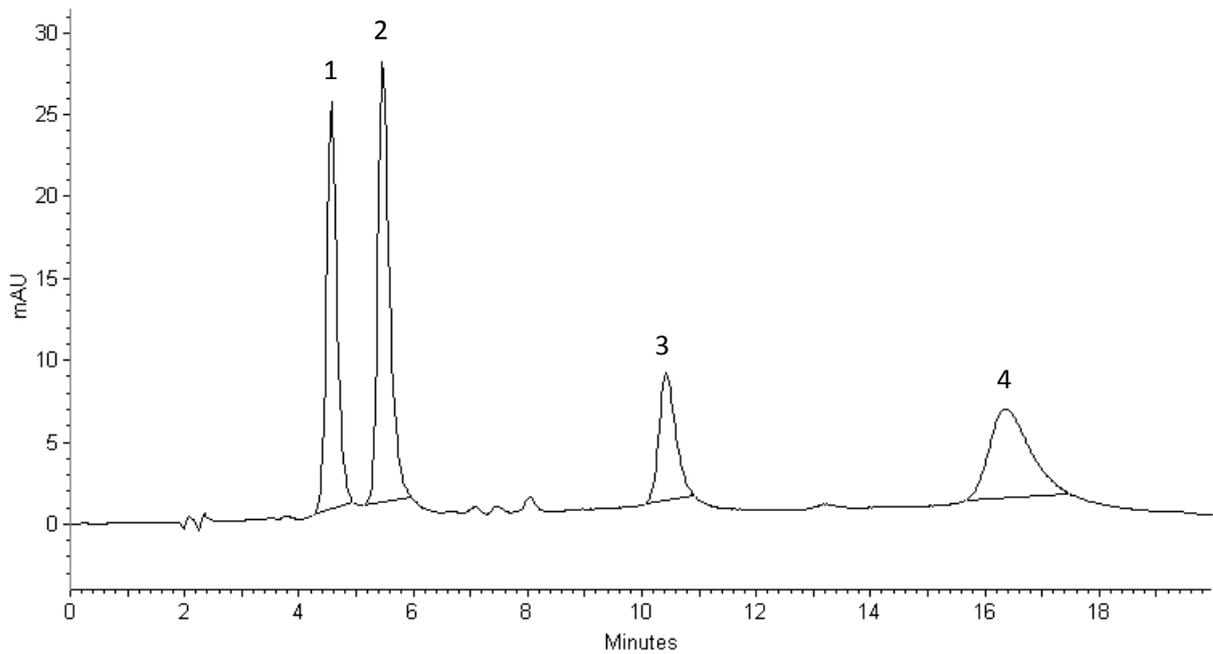


Figura 13 – Cromatograma de amostra de água (pH 5) adicionada de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4), na concentração de 200 µg L<sup>-1</sup>. Extração: MIP-1. Eluição: acetona.

### 5.2.5 Volume de ressuspensão

Buscando melhorar um pouco mais a resposta analítica, avaliou-se a influência do volume de fase móvel empregado na ressuspensão dos resíduos do eluato.

Para tanto, após a etapa de eluição, os volumes recolhidos em béqueres afunilados foram secos em banho de água a 50 °C sob fluxo de N<sub>2</sub> e, em seguida, os mesmos foram ressuspensos em 200, 300, 400 e 500 µL de fase móvel. Os resultados estão na Figura 14.

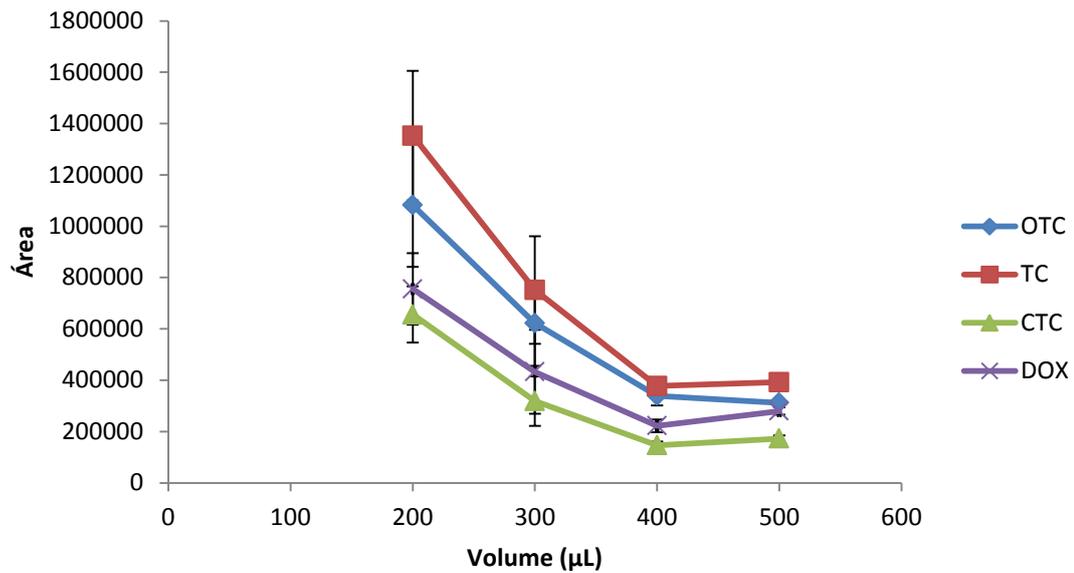


Figura14 – Influência do volume de ressuspensão na resposta analítica empregando-se amostras fortificadas com padrões de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Observando-se os resultados acima, é possível avaliar que o menor volume de ressuspensão ( $200 \mu\text{L}$ ) apresentou maior resposta para os quatro analitos, o que era esperado, uma vez que diminuindo o volume, há maior concentração dos analitos.

Porém, a diminuição do volume dificultou a completa ressuspensão dos resíduos do eluato na fase móvel e os valores de desvio padrão relativo apresentaram-se elevados, mesmo quando o tempo de agitação foi aumentado de um para dois minutos.

Portanto, diante de tais resultados, optou-se por manter como volume de trabalho o valor de  $500 \mu\text{L}$ .

### 5.2.6 Volume de injeção

Também com o intuito de se aumentar a sensibilidade, avaliou-se a influência do volume de injeção cromatográfica. Os volumes testados foram  $50$ ,  $100$  e  $150 \mu\text{L}$ .

Com o aumento do volume de  $50$  para  $150 \mu\text{L}$  as respostas aumentaram cerca de  $65 \%$  para OTC e TC e  $60 \%$  para CTC e DOX.

Volumes maiores não foram testados em função do alargamento dos picos, comprometendo a resolução cromatográfica principalmente entre OTC e TC. Assim, o valor de 150  $\mu\text{L}$  foi selecionado como volume de trabalho.

### 5.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Na última etapa da otimização, foram avaliadas as condições cromatográficas de análise.

Com a finalidade de melhorar a resolução entre a oxitetraciclina e a tetraciclina, e também na tentativa de reduzir o tempo de retenção da clortetraciclina e da doxiciclina, foram testadas fases móveis compostas por ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> e acetonitrila em diferentes proporções (50:50; 90:10; 70:30; 73:27; 75:25; 80:20; 78:22). Ao final dos experimentos, optou-se por trabalhar com o sistema gradiente de eluição.

Na Figura 15, a fase móvel composta por acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (50:50) parece apresentar elevado teor de solvente orgânico, provocando a co-eluição dos analitos em curto tempo de análise. Na Figura 16, por outro lado, a maior proporção de fase aquosa aumentou o tempo de análise e começou a mostrar sinais de separação. A Figura 17, com fase móvel composta por acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (30:70) apresenta os analitos separados, mas ainda com resolução ruim entre OTC e TC. A Figura 18 mostra a condição otimizada, onde a implantação de um sistema gradiente de eluição proporcionou boa separação para os quatro compostos em tempo de análise relativamente curto (15 minutos). O gradiente foi realizado utilizando-se fase móvel A (acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> – 20:80 v/v) de 0 a 3 minutos, fase móvel B (acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> – 25:75 v/v) de 3,01 a 13 minutos e novamente a fase móvel A de 13,01 a 15 minutos. O fluxo foi de 1 mL min<sup>-1</sup> de 0 a 3 minutos; em 3,01 minutos aumentou-se para 1,6 mL min<sup>-1</sup>, permanecendo assim até o final da corrida.

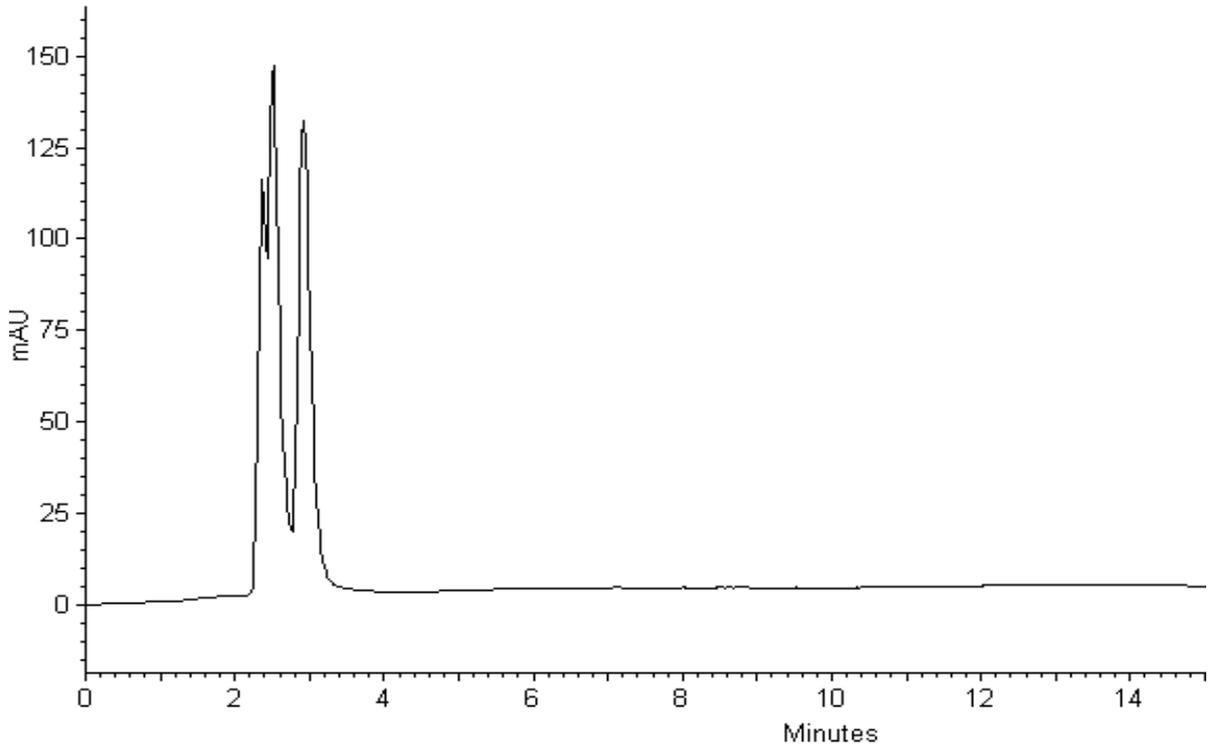


Figura 15 – Cromatograma de padrão misto de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (50:50).

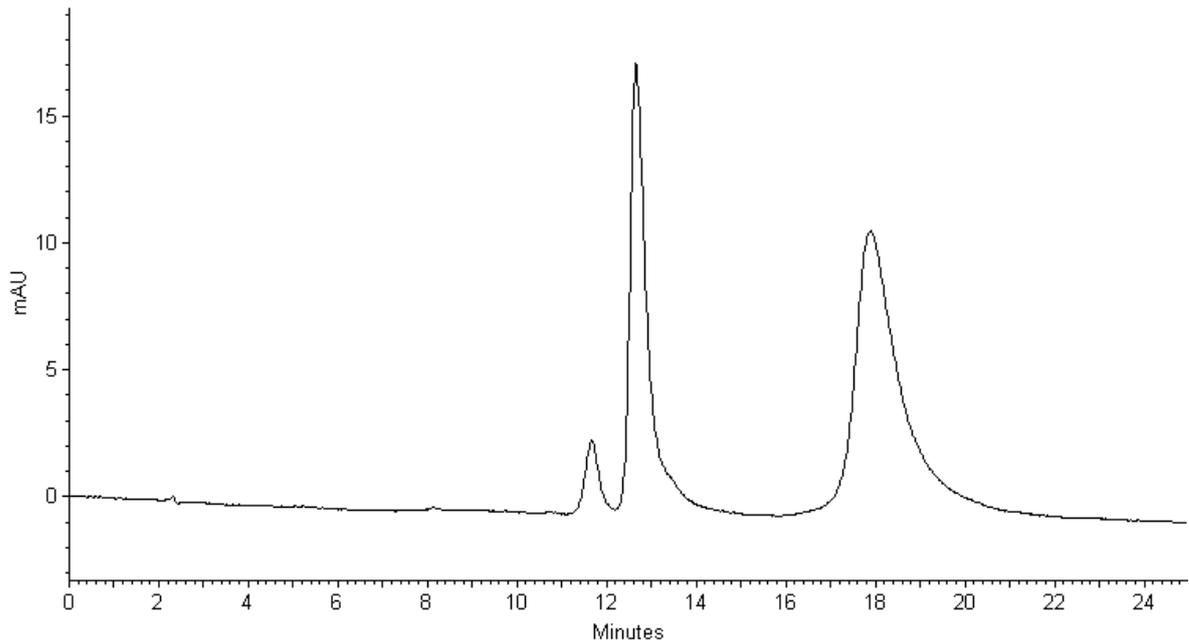


Figura 16 – Cromatograma de padrão misto de OTC, TC, CTC e DOX na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (10:90).

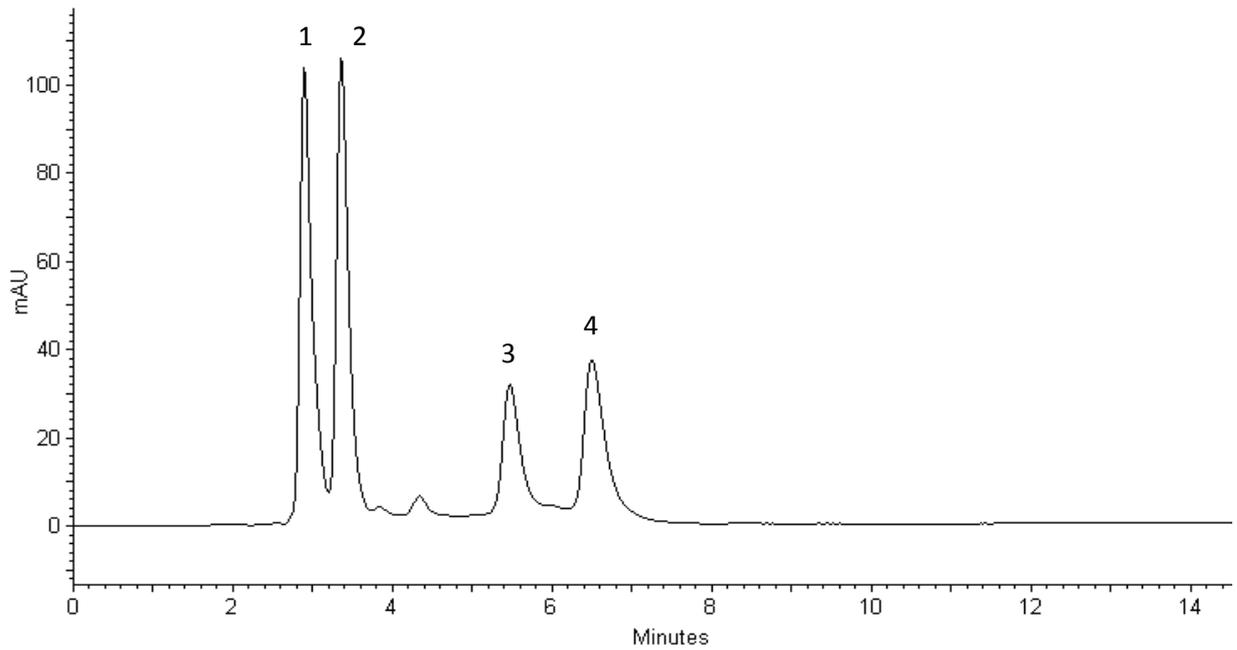


Figura 17 – Cromatograma de padrão misto de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4) na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (30:70).

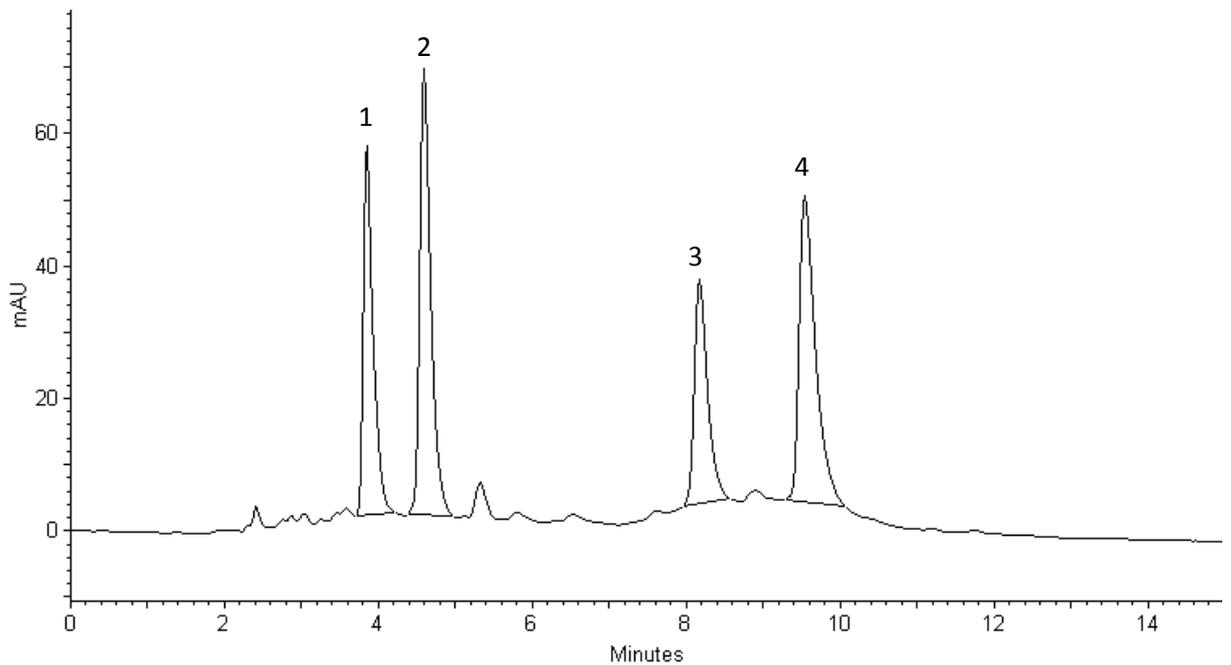


Figura 18 – Cromatograma de padrão misto de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4) na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (sem extração). Fase móvel: acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (20:80), fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  (0 – 3 minutos); acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (25:75), fluxo de  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$  (3,01 – 13 minutos); acetonitrila:ácido oxálico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (20:80), fluxo de  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$  (13,01 – 15 minutos).

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas, as etapas subsequentes de condicionamento do disco durante a extração e ressuspensão em fase móvel foram realizadas com a fase móvel A – acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L<sup>-1</sup> (20:80 v/v).

A Figura 19 compara os resultados obtidos em duas situações distintas: uma análise nas condições de partida (pré-otimização) e outra análise nas condições otimizadas. Em ambos os casos, foram extraídas amostras de água fortificadas com os padrões OTC, TC, CTC e DOX. As condições do experimento nos dois momentos foram descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições experimentais pré e pós-otimização

Parâmetro	Condições de partida	Condições otimizadas
pH da amostra	Sem ajuste	5
Volume de extração (mL de água)	100	300
Volume de condicionamento (mL de fase móvel)	30	20
Eluição (5 mL)	Fase móvel	Acetona
Volume de ressuspensão (µL de fase móvel)	500	500
Volume de injeção (µL)	50	150
Composição da fase móvel	Metanol:acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> 10:17:73 v/v/v	Acetonitrila:ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> 20:80 v/v

É possível observar que após a otimização, as respostas analíticas são claramente melhores para os quatro analitos, o que mostra também que a alteração na composição da fase móvel empregada na etapa de condicionamento do disco durante o processo de extração modificou positivamente este procedimento.

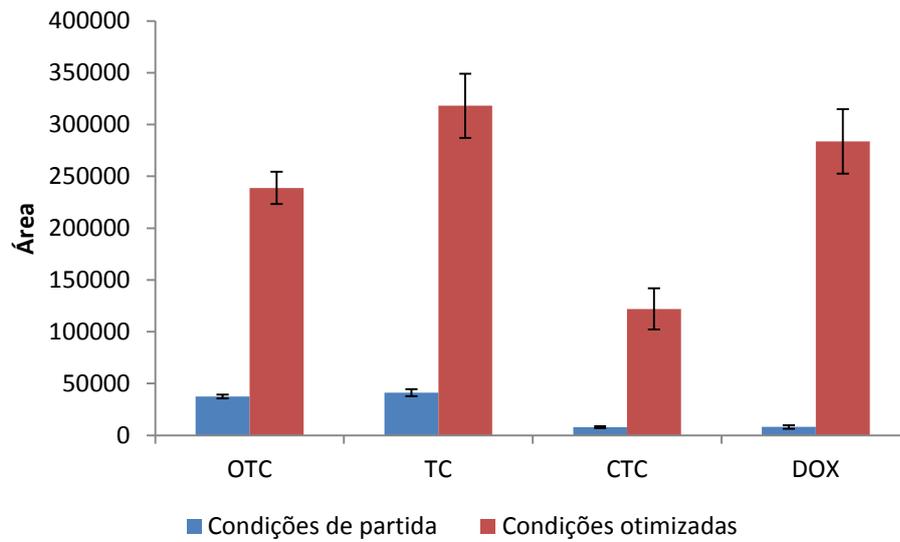


Figura 19 – Comparação entre condições pré e pós-otimização do método de extração e análise. Extrações realizadas com amostras fortificadas na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 5.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação foi realizada com base nos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade da amostra.

O método desenvolvido mostrou-se linear na faixa de concentração de 5 a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , com coeficientes de correlação linear ( $r$ ) maiores que 0,99 para os quatro analitos.

Os dados referentes à linearidade foram organizados na Tabela 5 e as curvas analíticas estão representadas nas Figuras 20, 21, 22 e 23.

Tabela 5 – Resultados dos testes de linearidade.

Analito	Equação	$r$
Oxitetraciclina	$y = 2408,0 x - 455,9$	0,997
Tetraciclina	$y = 3072,7 x + 2181,9$	0,997
Clortetraciclina	$y = 1709,9 x - 1052,7$	0,997
Doxicilina	$y = 3173,3 x - 8828,9$	0,998

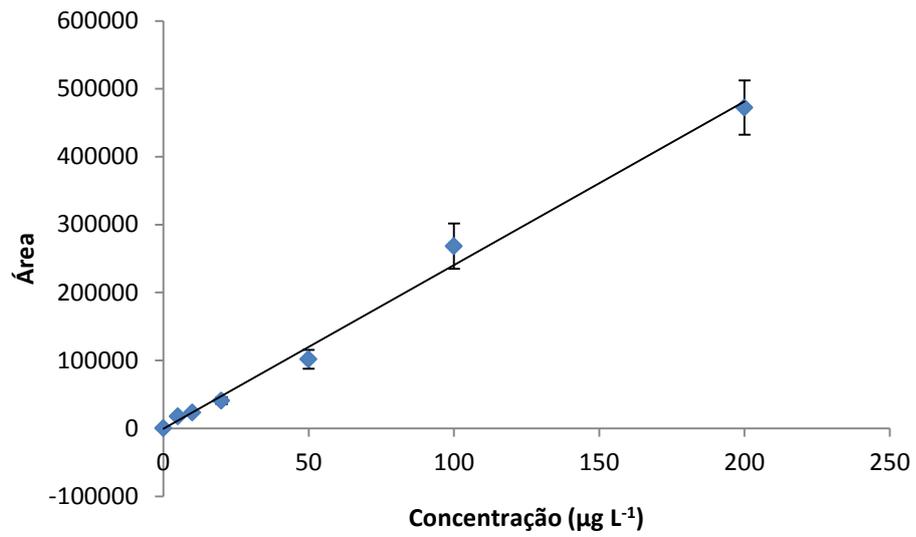


Figura 20 – Curva analítica para oxitetraciclina.

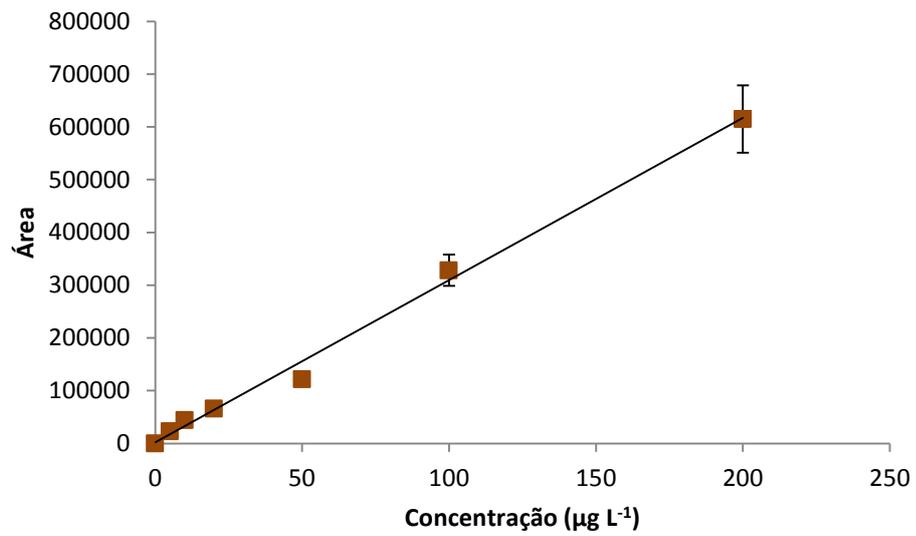


Figura 21 – Curva analítica para tetraciclina.

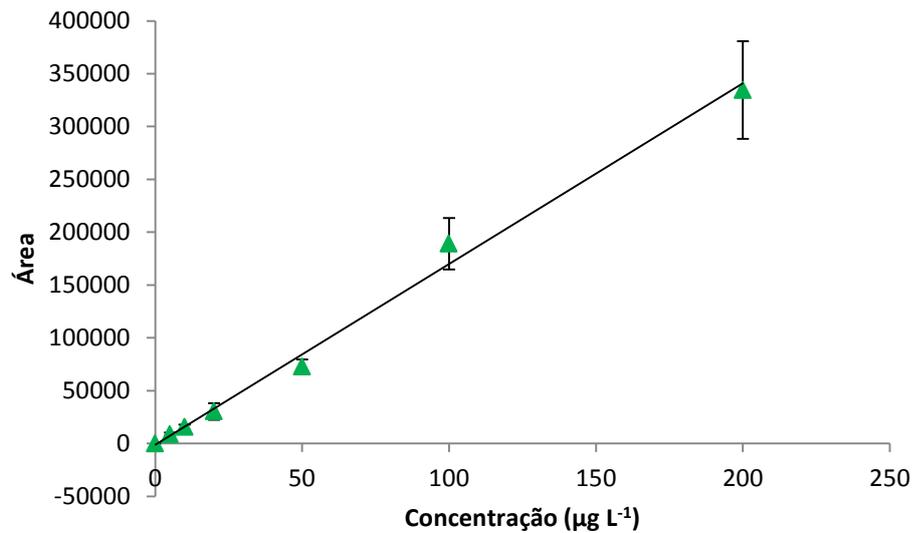


Figura 22 – Curva analítica para clortetraciclina.

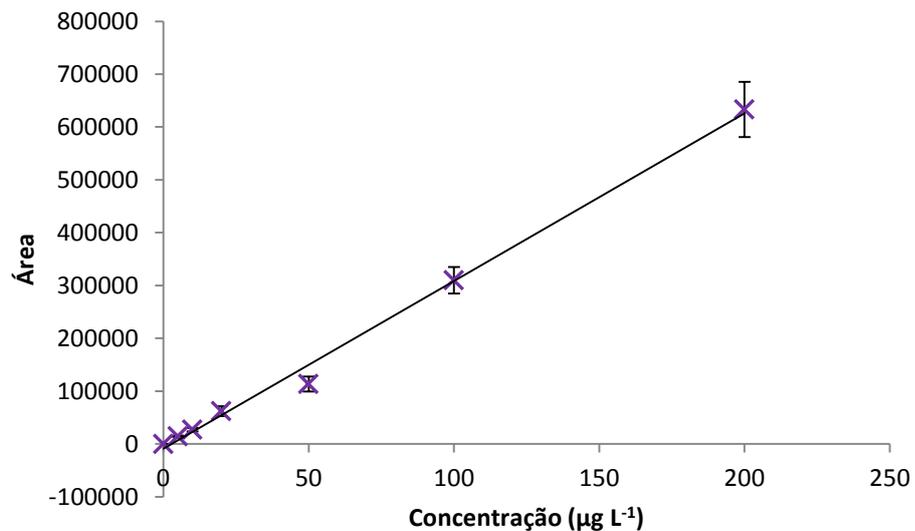


Figura 23 – Curva analítica para doxiciclina.

Como há relatos em literatura da presença destes analitos em concentrações que variam de  $\text{ng L}^{-1}$  até  $\text{mg L}^{-1}$ , o intervalo analítico de 5 a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  foi considerado satisfatório para análises de tetraciclinas em águas, sabendo-se que se trata de uma técnica moderadamente sensível como HPLC-UV.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados de precisão e exatidão para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina.

Tabela 6 – Resultados de precisão e exatidão para OTC, TC, CTC e DOX

		OTC		TC		CTC		DOX	
Intra-dias	CN <sup>a</sup>	10	100	10	100	10	100	10	100
	CA <sup>b</sup>	9,76	111,59	13,68	106,05	9,68	111,22	11,32	100,48
	DPR <sup>c</sup>	8,36	12,41	10,51	9,04	15,07	12,85	12,75	8,07
	E <sup>d</sup>	-2,37	11,59	36,78	6,05	-3,17	11,22	13,25	0,48
Inter-dias	CN <sup>a</sup>	10	100	10	100	10	100	10	100
	CA <sup>b</sup>	10,22	98,94	11,70	101,54	10,51	92,43	12,08	92,90
	DPR <sup>c</sup>	10,86	14,03	16,70	9,45	7,34	18,88	10,69	11,11
	E <sup>d</sup>	2,17	-1,06	17,04	1,54	5,14	-7,57	20,76	-7,10

<sup>a</sup>Concentração nominal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); <sup>b</sup>Concentração analisada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); <sup>c</sup>Desvio padrão relativo (%); <sup>d</sup>Erro relativo (%).

Como pode ser observado, apenas a exatidão intra-dias para TC foi maior que 20%, provavelmente devido a algum erro experimental. Esta hipótese pode ser justificada considerando-se a exatidão inter-dias para o mesmo analito (17%).

O limite de quantificação foi definido como  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo a concentração que gera relação sinal-ruído superior a 10:1, enquanto o limite de detecção foi definido como  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo a concentração que gera sinal maior que três vezes o ruído da linha de base. Tais valores puderam ser alcançados em função da extração utilizando-se MIP como sorvente, além das etapas de secagem e ressuspensão; a técnica empregada proporcionou a obtenção de elevados fatores de pré-concentração, como 14, 19, 29 e 41 para OTC, TC, CTC e DOX respectivamente.

A Figura 24 apresenta um cromatograma de amostra fortificada em concentração igual ao limite de quantificação de cada analito. Como pode ser visto, os picos são bem definidos e facilmente integrados.

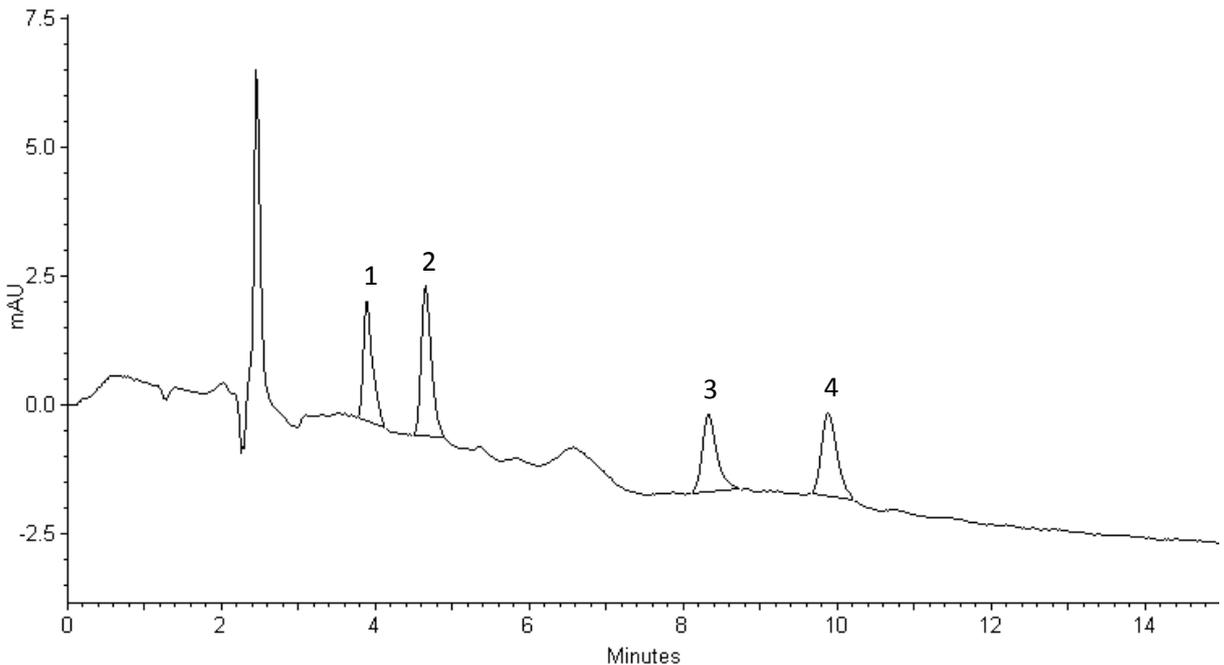


Figura 24 – Cromatograma de amostra de água (pH 5) adicionada de OTC (1), TC (2), CTC (3) e DOX (4), na concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (limite de quantificação).

Sabe-se que as tetraciclinas são compostos naturalmente instáveis (ŠKRÁŠKOVÁ et al, 2013). Com os resultados do teste de estabilidade foi possível verificar que as amostras de água fortificadas nas concentrações de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  com os quatro analitos – OTC, TC, CTC e DOX – não apresentaram estabilidade mesmo armazenadas em frascos âmbar à temperatura de refrigeração ( $2$  a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ), conforme pode ser observado na Figura 25.

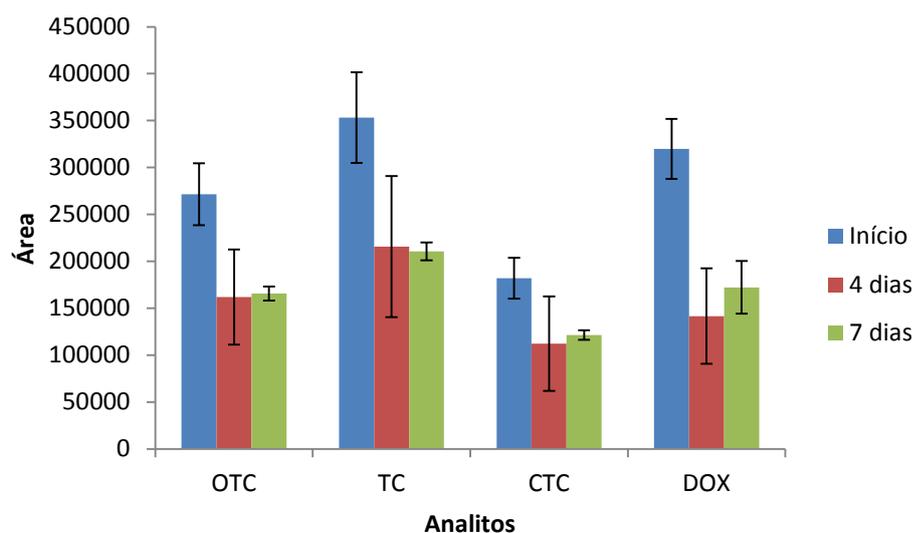


Figura 25 – Estabilidade dos analitos em água.

Já no intervalo de quatro dias, os analitos OTC, TC, CTC e DOX apresentaram, respectivamente, 40,37%, 38,94%, 38,38% e 55,76% de perda de resposta analítica em relação à análise no tempo zero.

Portanto, sugere-se que as amostras sejam analisadas no mesmo dia da coleta no meio ambiente.

A Tabela 7 apresenta alguns métodos de análise de tetraciclinas em água, com as respectivas técnicas de preparo de amostra e detecção, assim como os limites de quantificação obtidos. Pode-se observar que há uma grande tendência de utilização de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à detecção por espectrometria de massas. Porém, na ausência de equipamentos caros, para fins de triagem, ou ainda quando se trata de amostras onde a concentração de analitos é da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o emprego de HPLC com detecção ultravioleta e material pré-concentrador (MIP) na etapa de extração pode atender satisfatoriamente as necessidades analíticas.

Tabela 7 – Métodos de análise de tetraciclinas em amostras de água

Método	Preparo de Amostra	Limite de Quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				Referência
		OTC	TC	CTC	DOX	
HPLC-MS	SPE			0,1		LINDSEY, MEYER, THURMAN, 2001
UHPLC-TUV <sup>b</sup>	DLLME <sup>a</sup>	0,26	0,10	0,13	0,14	HOU, GUAN, DI, 2011
UHPLC-FLR <sup>c</sup>	SPE	0,7	0,7	5	1	ŠKRÁŠKOVÁ et.al, 2013
UHPLC-MS/MS	SPE	0,01	0,01	0,1	0,05	ŠKRÁŠKOVÁ et.al, 2013
HPLC-UV	SPE em disco	5	5	5	5	Método proposto

<sup>a</sup>Microextração líquido-líquido dispersiva.

<sup>b</sup>Detecção ultravioleta ajustável.

<sup>c</sup>Detecção por fluorescência.

Ainda em relação a técnicas já descritas em literatura, Li et al. (2011) desenvolveram método de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) com detecção ultravioleta para análise de oxitetraciclina em amostras de água, empregando-se SPE. A faixa linear definida foi de 0,15 a 10  $\text{mg L}^{-1}$ , sendo o primeiro ponto ( $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ) trinta vezes maior que o valor alcançado com o método proposto neste trabalho ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), mostrando, mais uma vez, que é possível alcançar bons limites de quantificação com a detecção ultravioleta utilizando-se técnicas mais apuradas de preparo de amostra.

## 5.5 AMOSTRAS

Amostras de águas da represa de Furnas da região de Alfenas – MG foram coletadas e analisadas para verificação da possível presença de antibióticos da classe das tetraciclina.

Das cinco amostras analisadas, nenhuma apresentou picos nos tempos de retenção da OTC, TC, CTC e DOX. As amostras 3 e 5, porém, apresentaram um pico em 6 minutos. Tal sinal pode ser decorrente da presença de alguma substância interferente capaz de absorver na mesma região do ultravioleta (355 nm).

As Figuras 26, 27 e 28 apresentam os cromatogramas de algumas das amostras analisadas. Diante de tais resultados, pode-se indicar que não foram detectadas tetraciclina nas águas analisadas ou que elas estão presentes em concentrações abaixo do limite de detecção do método.

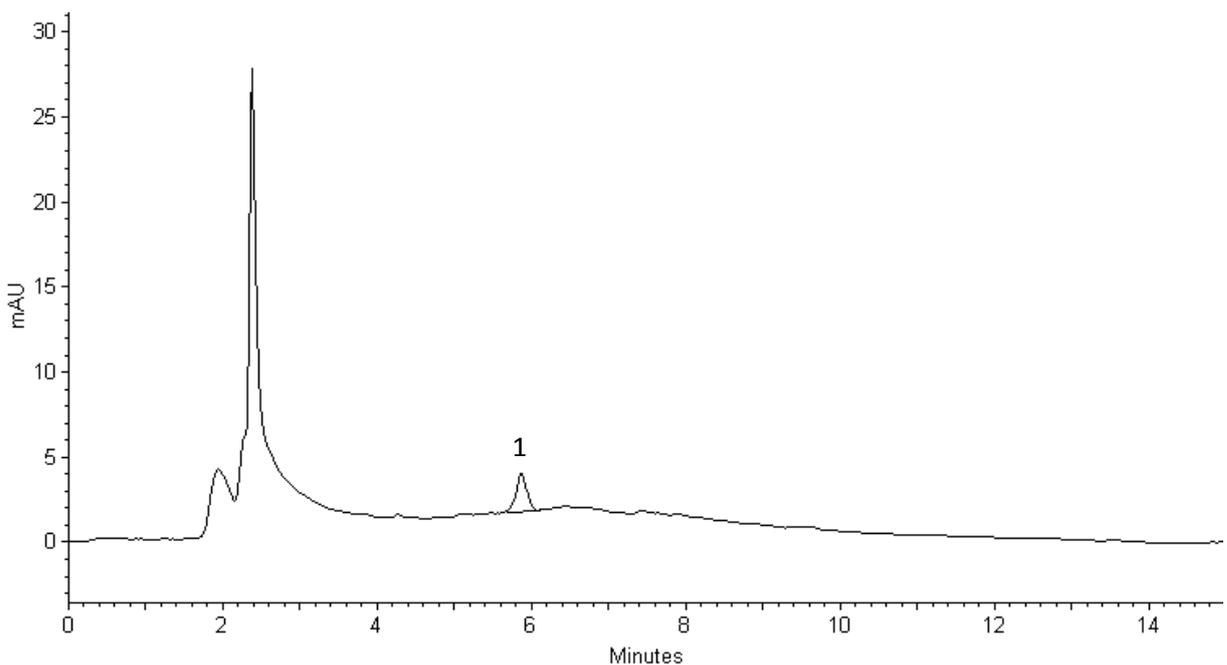


Figura 26 – Cromatograma da amostra 3. Presença de substância interferente (1) em tempo de retenção não correspondente ao das tetraciclina.

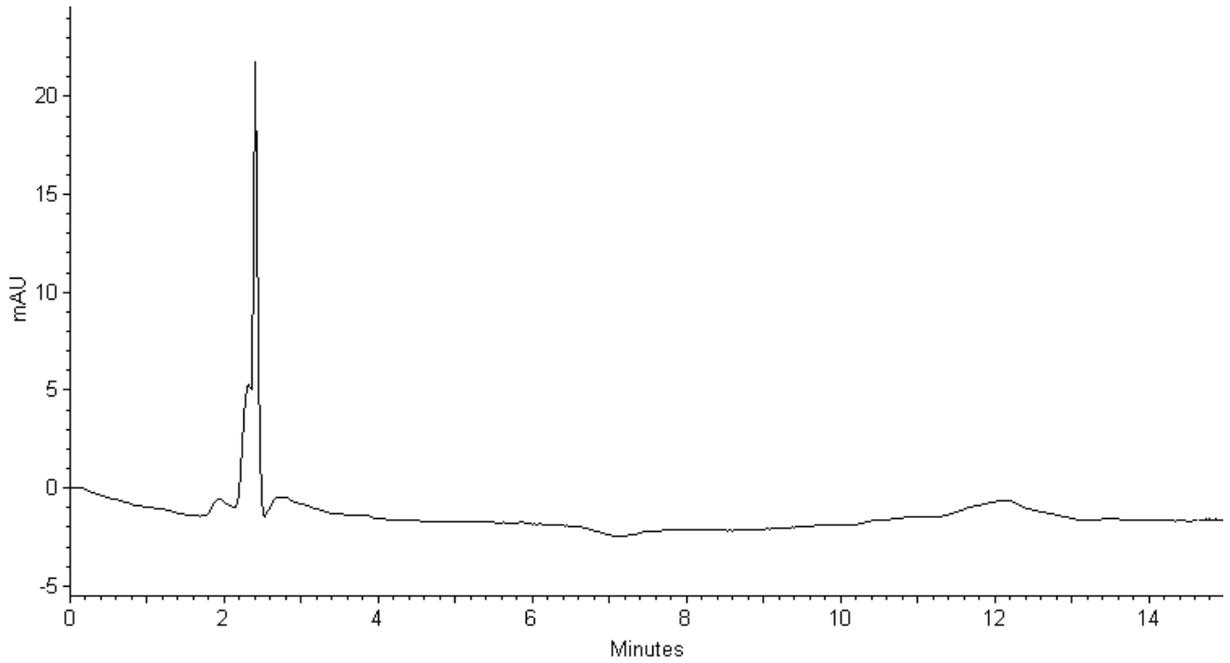


Figura 27 – Cromatograma da amostra 4.

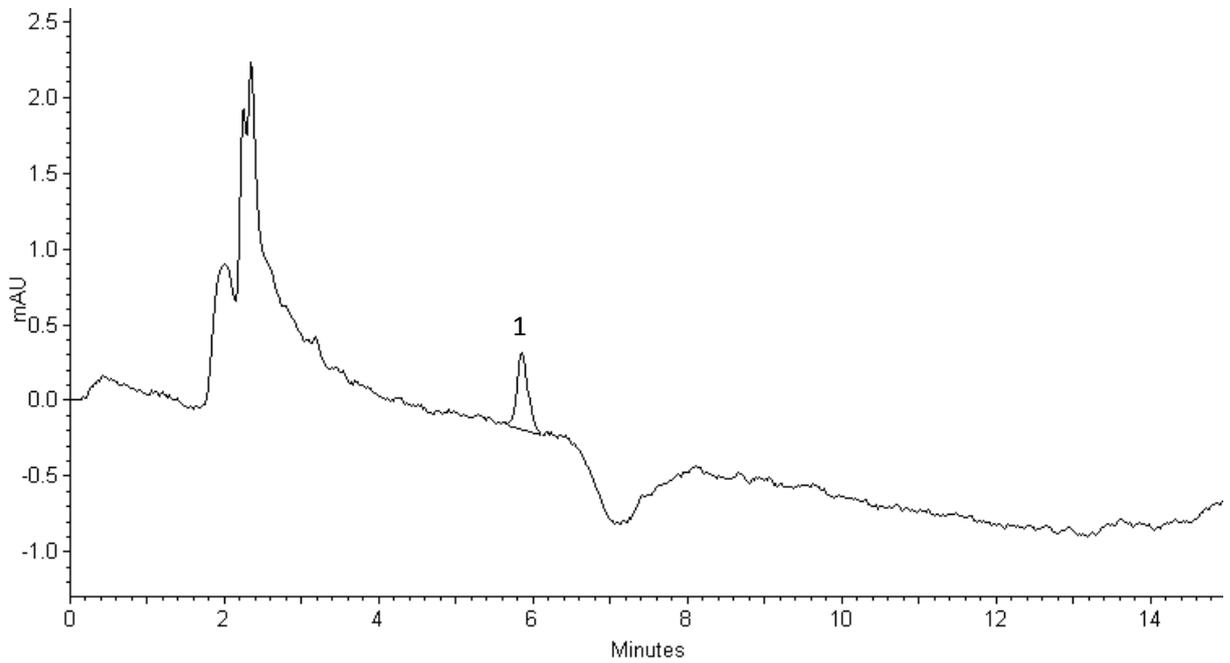


Figura 28 – Cromatograma da amostra 5. Presença de substância interferente (1) em tempo de retenção não correspondente ao das tetraciclinas.

## 6 CONCLUSÃO

A SPE em disco é rápida e de fácil execução, permitindo a extração de volumes maiores do que quando se trabalha com cartuchos convencionais, o que é bastante importante para a análise de amostras ambientais.

O emprego de polímeros com revestimento superficial hidrofílico como sorvente é de grande interesse, pois além de aumentar a seletividade do processo de extração, ainda torna o material mais compatível com sistemas aquosos e diminui a adsorção não específica. Além disso, o polímero é de preparo relativamente fácil e, várias extrações podem ser realizadas com o mesmo material.

A metodologia em questão mostrou-se promissora para a extração seletiva de tetraciclinas de amostras de água com elevados fatores de pré-concentração, como 14, 19, 29 e 41 para OTC, TC, CTC e DOX respectivamente.

Como medicamentos são considerados poluentes orgânicos emergentes e ainda não há limites estabelecidos pelas legislações vigentes para tetraciclinas (e demais antibióticos), o limite de quantificação alcançado ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) mostra que é possível chegar a concentrações próximas daquelas detectadas com a espectrometria de massas empregando-se detecção ultravioleta, o que pode ser, em partes, atribuído à utilização de MIP como sorvente na extração.

## REFERÊNCIAS

AZODI-DEILAMI, S.; ABDOUSS, M; HASANI, S. A. Preparation and utilization of a molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of tramadol. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, p. 861-869, 2010.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 14 dez. 2011.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1137-1144, 2006.

Comissão Europeia, Diretiva 2000/60/CE do Parlamento e Conselho Europeu, de 23 de outubro de 2000.

Comissão Europeia, Diretiva 2008/105/CE do Parlamento e Conselho Europeu, de 16 de Dezembro de 2008.

CHICO, J. et al. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography – Application to food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, p. 1-8, 2008.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.

DOLLIVER, H.; GUPTA, S. Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 1227-1237, 2008.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 361-375, 2008.

HARNISZ, M.; GOŁAŚ, I; PIETRUK, M. Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters – The example of the Drwęca River Nature Reserve (Poland). **Ecological Indicators**, v. 11, p. 663–668, 2011.

HERNÁNDEZ, F. et al. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 466-485, 2007.

HERNÁNDEZ, M.; BORRULL, F.; CALLUL, M. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 416-427, 2003.

HOA, P. T. P. et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 2894-2901, 2011.

HOSHINA, K. et al. Molecularly imprinted polymers for simultaneous determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4957-4962, 2009.

HOU, D.; GUAN, Y.; DI, X. Temperature-induced ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction of tetracycline antibiotics in environmental water samples assisted by complexation. **Chromatographia**, v. 73, p.1057-1064, 2011.

JING, T. et al. Preparation of high selective molecularly imprinted polymers for tetracycline by precipitation polymerization. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 1535-1538, 2007.

KHONG, S.; HAMMEL, Y.; GUY, P. A. Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 493-502, 2005.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, 2009.

LA FARRÉ et al. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 991-1007, 2008.

LI, R. et al. Hydrophilic interaction chromatographic determination of oxytetracycline in the environmental water using silica column. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, p. 511-520, 2011.

LIDE, D. R. (Ed.). **Handbook of Chemistry and Physics**. 85 ed., New York: CRC Press, 2004.

LINDSEY, M. E.; MEYER, M.; THURMAN, E. M. Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 4640-4646, 2001.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 305-315, 2013.

MAIA, P. P.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 109, p. 212-218, 2008.

MAMANI, M. C. V. **Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2007. 208 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2007.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2893-2902, 2009.

NETO, A. J. S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos C18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de Furnas (MG-Brasil). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.

O' CONNOR, S.; AGA, D. S. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: advances in extraction, clean-up, and quantification. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 456-465, 2007.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, 109-133, 2000.

POOLE, C. F. et al. Determination of kinetic and retention properties of cartridge and disk devices for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 245-259, 1997.  
PUIG, P. et al. Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 664-678, 2007.

PUOCI, F. et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1634-1640, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

SAMBE, H.; HOSHINA, K.; HAGINAKA, J. Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization method – Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 130-137, 2007.

SELLERGREN, B.; LANZA, F. Molecularly imprinted polymers in solid phase extractions. In: SELLERGREN, B. **Molecularly Imprinted Polymers – Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry**. Germany: Johannes Gutenberg University Mainz, 2003.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

ŠKRÁŠKOVÁ, K. et al. Fast and sensitive UHPLC methods with fluorescence and tandem mass spectrometry detection for the determination of tetracycline antibiotics in surface waters. **Journal of Chromatography B**, v. 927, p. 201-208, 2013.

SUN, X. et al. Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 79, p. 926-934, 2009.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076-1086, 2005.

THURMAN, E. M.; SNAVELY, K. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 18-26, 2000.

US – EPA (United States – Environmental Protection Agency). National Ocean Service. NCCOS (The National Centers for Coastal Ocean Science). PEIAR (Pharmaceuticals in the Environment, Information for Assessing Risk). Disponível em: <<http://www.chbr.noaa.gov/peiar>>. Acesso em: 12 set. 2011.

VERA-CANDIOTI, L.; OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H.C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 82, p. 213-221, 2010.

WATABE, Y. et al. Novel surface modified molecularly imprinted polymer focused on the removal of interference in environmental water samples for chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 363-370, 2005.

ZHOU, J. L.; MASKAOUI, K.; LUFADJEU, A. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 731, p. 32-39, 2012.