



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



**Desenvolvimento e Validação de Método Analítico
Utilizando LC-MS/MS para Determinação de
Macrolídeos em Carne de Tilápia do Nilo (*Oreochromis
niloticus*)**

Marcela Sismotto Gandara

Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos.

Campinas - SP
2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

Si83d Sismotto, Marcela
Desenvolvimento e validação de método analítico utilizando LC-MS/MS para determinação de macrolídeos em carne de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Marcela Sismotto. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Macrolídeos. 2. Espectrometria de massas. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Tilápia do Nilo. 5. Aquicultura. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Development and validation of analytical method using LC-MS/MS for the determination of macrolides in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) meat

Palavras-chave em inglês (Keywords): Macrolides, Mass spectrometry, High performance liquid chromatography, Nile tilapia, Aquaculture

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes
Marili Vila Nova Rodrigues
Maria Tereza de Alvarenga Freire
Regina Prado Zanes Furlani
Vera Lúcia Ferracini

Data da Defesa: 23/02/2011

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Marcela Sismotto Gandara, aprovado pela Comissão Julgadora em 23 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

.....
Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Orientador)

.....
Dra. Marili Vila Nova Rodrigues
(Membro)

.....
Dra. Maria Tereza de Alvarenga Freire
(Membro)

.....
Dra. Regina Prado Zanes Furlani
(Suplente)

.....
Dra. Vera Lúcia Ferracini
(Suplente)

Campinas-SP

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a
meu filho Thiago César, que
tem sido fonte de motivação e
inspiração em todos os
aspectos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de vir a este mundo em condições tão privilegiadas.

Às minhas “famílias”:

A primeira que tive: meu pai, minha mãe e minha irmã, pelo aprendizado constante desde os primeiros momentos desta vida, e principalmente aos meus pais, por não permitirem que eu esmorecesse frente aos obstáculos que se apresentaram na vida pessoal e profissional.

A meu esposo Irineu, que me proveu de motivação para realizar muitos dos meus projetos de vida; e a meu filho Thiago, que faz parte de todos os meus projetos e me completa como mulher e profissional.

Ao professor Felix G. R. Reyes, por apostar em meu potencial e viabilizar a realização desta pesquisa em conjunto com minhas atribuições de engenheira de alimentos no Laboratório de Toxicologia de Alimentos da FEA – UNICAMP.

Ao Dr. Jonas A. R. Paschoal pelo suporte e orientações na pesquisa

À Maria José Chagas e à Silvia Helena Vitorino pelo suporte no laboratório.

E finalmente aos alunos de pós-graduação do Laboratório de Toxicologia de Alimentos, pelos momentos de estudo e discussão sobre a pesquisa, e em especial à Juliana A. Teles, à Renata A. Estaiano, à Luciana C. Branco pelo apoio na bancada e à Michele Del Bianchi, pelas amostras.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	1
SUMMARY	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
Análise de resíduos de macrolídeos em alimentos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas – aspectos analíticos e regulatórios – uma revisão.....	8
Abstract.....	8
Introdução	9
Objetivo	10
Macrolídeos: Produção, características químicas e aplicações na medicina veterinária.....	11
Métodos analíticos.....	15
Preparo de amostras.....	15
Separação cromatográfica.....	20
Técnicas de detecção	21
Espectrometria de massas.....	22
Ionização.....	22
Espectrômetros de massa.....	25
Validação de Métodos Analíticos.....	34
Presença de macrolídeos em alimentos e aspectos de regulamentação	40
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	46
A simple LC-QToF method for macrolides determination in tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) fillets.	54
Abstract.....	54
Introduction	55
Materials and Methods	57
Samples.....	57
Solvents and Reagents.....	60
Standard Solutions.....	60
Equipment.....	61
Sample Preparation.....	62
LC-QToF Conditions.....	62
Method Validation.....	63
Conclusions	72
Abbreviations used	73
Acknowledgements	74
Literature Cited.....	74
CONCLUSÕES GERAIS	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I. Análise de resíduos de macrolídeos em alimentos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas – aspectos analíticos e regulatórios - uma revisão.

Tabela 1. Condições de análise para quantificação de macrolídeos por LC-MS ou UHPLC-MS.....	30
Tabela 2. Relação entre os fragmentos mássicos e os pontos de identificação obtidos.....	36
Tabela 3. Limites máximos de resíduos (em $\mu\text{g.kg}^{-1}$) de alguns macrolídeos em várias matrizes alimentícias.....	42

CAPÍTULO II. A simple LC-QToF method for macrolides determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets.

Table 1. Origin of the samples submitted to the developed method.....	59
Table 2. Origin of analytical standards and concentration of standard solutions.....	61
Table 3. Maximum residue limits (MRL) adopted for method validation.....	64
Table 4. HPLC – QToF macrolides quantification method validation results	67
Table 5. Relative intensities of protonated molecules and the respective sodium adduct ions ($[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{Na}]^+$) in the presence and absence of tilapia fillet matrix.....	67
Table 6. Macrolides molecular formulas, monoisotopic masses, quantification ions, collision energies applied to obtain fragmentation spectra, confirmation ions and resulting identification points.....	70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I. Análise de resíduos de macrolídeos em alimentos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas – aspectos analíticos e regulatórios - uma revisão.

Figura 1. Estrutura molecular da eritromicina e seus compostos relacionados.....	12
Figura 2. Estruturas moleculares da espiramicina (a) e da neoespiramicina (b).....	13
Figura 3. Estruturas moleculares da tilosina A e seus compostos relacionados.....	14
Figura 4. Estrutura molecular da tilmicosina.....	15

**CAPÍTULO II. A simple LC-QToF method for macrolides determination in tilapia
(*Oreochromis niloticus*) fillets.**

Figure 1. Molecular structure of the studied macrolides.....	58
Figure 2. Macrolides matrix-matched calibration curves	68
Figure 3. (a) Example of macrolides chromatograms in tilapia fillet matrix (1.5 x MRL) and (b) the respective blank tilapia fillet chromatograms.....	69
Figure 4. Macrolides fragmentation spectra	71

RESUMO GERAL

Neste trabalho as técnicas analíticas mais recentes aplicadas para determinação de macrolídeos em alimentos, incluindo o preparo de amostras e a validação das metodologias, foram estudadas. As políticas atualmente adotadas pelas agências reguladoras no que diz respeito a sua presença em alimentos também foram discutidas.

Um método simples para a identificação e quantificação de cinco macrolídeos (eritromicina, josamicina, tilmicosina, tilosina e espiromicina) em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por HPLC associada à espectrometria de massas híbrida quadrupolo-tempo de voo (QToF) foi desenvolvido e validado. O preparo de amostra foi realizado através de extração e desproteinização com etanol, remoção de material graxo com hexano e concentração por evaporação do solvente. A calibração foi realizada pela técnica de superposição da matriz devido ao efeito matriz significativo para a maioria dos analitos, com exceção da tilosina. Os limites de quantificação obtidos foram menores que 45% dos valores dos limites máximos de resíduos (LMR) adotados. As diferenças entre os limites de decisão ($CC\alpha$) obtidos e os LMR foram menores que 10%. Considerando os critérios de validação adotados, verificou-se que o método desenvolvido está de acordo com as recomendações da União Europeia (EC/2002) para a análise de contaminantes em alimentos.

SUMMARY

The latest analytical techniques applied for the determination of macrolides in food, including sample preparation and validation of methodologies were studied in this work. The policies currently adopted by regulatory agencies regarding their presence in food were also discussed.

A simple method for the identification and quantification of five macrolides (erythromycin, josamycin, tilmicosin, tylosin and spiramycin) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets by HPLC coupled to hybrid quadrupole-time of flight (QToF) mass spectrometry was developed and validated. Sample preparation was carried out by extraction and deproteinization with ethanol and hexane deffating of the extract, followed by concentration of the analytes by solvent evaporation. Matrix matched calibration was applied due to significant matrix effect for all analytes, except tylosin. The quantification limits obtained were lower than 45% of the values of maximum residue limits (MRLs) adopted. The differences between the decision limits ($CC\alpha$) and MRLs were less than 10%. Considering the validation criteria adopted, it was found that the developed method is in accordance with the recommendations of the European Union (EC/2002) for the analysis of contaminants in food.

INTRODUÇÃO GERAL

Os antimicrobianos são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, podendo ser utilizados na produção animal para: (a) tratar enfermidades (terapêutico), (b) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático), e (c) melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento). Uma grande variedade de substâncias antimicrobianas é usada na produção animal em todo o mundo. Dentre os antimicrobianos utilizados na pecuária, destacam-se os macrolídeos, por serem altamente potentes contra uma grande variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. A organização Mundial para a saúde animal (OIE, 2007) considera alguns macrolídeos como criticamente importantes na pecuária, já que existem poucos tratamentos alternativos para algumas doenças que atingem algumas espécies de bois, porcos, cabras, ovelhas, cavalos, coelhos, aves, abelhas e peixes.

O potencial uso incorreto dessas substâncias por parte dos produtores, em contrariedade às Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, pode levar à presença de resíduos das mesmas em produtos alimentícios, representando risco à saúde dos consumidores, visto que acarreta na seleção de formas resistentes de microrganismos em relação ao agente ativo da substância utilizada, e também em efeitos tóxicos como a carcinogênese, mutagênese, teratogênese e a hipersensibilidade. Sendo assim, a presença de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal tem chamado à atenção de órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública, das indústrias de alimentos e dos consumidores, frente às questões da segurança alimentar, da resistência bacteriana e das barreiras alfandegárias aplicadas pelo mercado externo.

Sendo o Brasil um país de expressiva atividade pecuária no cenário mundial, programas que garantam a qualidade de alimentos desta origem são importantes para a economia nacional, e para atender a essa demanda, o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que possibilitem a determinação de medicamentos veterinários em níveis residuais nestas matrizes é indispensável.

A tilapia é mundialmente a espécie de peixe mais cultivada na aquicultura, com uma projeção de vendas de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas para 2010, representando um valor de venda em torno de 5 bilhões de dólares (FAO, 2010). Neste contexto, a aquicultura da tilápia se apresenta como um mercado bastante promissor e competitivo, onde o uso de antimicrobianos é praticamente inevitável, já que a alta densidade populacional nos tanques propicia a propagação de doenças causadas por microrganismos.

Alguns países, como o Japão (The Japan Food Chemical Research Foundation, 2010) e os membros da Comunidade Europeia (EMEA, 2010), estabeleceram limites máximos de resíduos de macrolídeos em pescados através de suas agências reguladoras. É importante ressaltar que os Estados Unidos (FDA, 2010), que é o maior importador mundial de filés frescos de tilápia, e o Brasil (MAPA, 2010) não aprovam o uso de nenhum antimicrobiano da classe dos macrolídeos na aquicultura.

Esta dissertação apresenta em seu primeiro capítulo uma revisão sobre as técnicas analíticas mais recentes aplicadas para a quantificação e confirmação de resíduos de macrolídeos em alimentos, versando sobre os métodos para o preparo das amostras, para a separação cromatográfica e detecção destas substâncias e também sobre a validação das metodologias. As diferentes técnicas de espectrometria de massas usadas para a detecção,

quantificação e confirmação de identidade são enfatizadas. Aspectos regulatórios preconizados por vários países, bem como os limites máximos de resíduos (LMR) de macrolídeos em alimentos de origem animal aplicados por suas agências reguladoras também são abordados.

O Segundo capítulo apresenta um método analítico desenvolvido e validado para a identificação e quantificação de cinco macrolídeos (eritromicina, josamicina, tilmicosina, tilosina e espiramicina) em filés de tilápia. A técnica analítica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e para a detecção, quantificação e confirmação de identidade foi aplicada a espectrometria de massas híbrida, através de um espectrômetro do tipo quadrupolo-tempo de voo (QToF), com fonte de ionização por eletronebulização. Após a validação, o método foi aplicado para analisar amostras de tilápia disponíveis ao consumidor no estado de São Paulo.

Referências Bibliográficas

1. World Organization for animal health (OIE). List of antimicrobials of veterinary importance. **2007**, Paris, France. Disponível em http://www.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf (acessada em 13/12/2010).
2. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Fishery and Aquaculture Statistics. **2009**, Rome, Italy. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1013t/i1013t.pdf> (acessada em 17/11/2010).
3. EMEA. European Medicines Agency. Maximum Residue Limits Reports. Disponível em http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC0b01ac058006488e (acessada em 20/12/2010).

4. FDA. United States Food and Drug Administration – Aquaculture Approved Drugs. Disponível em <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm> (acessada em 17/12/2010).
5. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União de 03/05/2010, Seção 1, Página 27.
6. The Japan Food Chemical Research Foundation. Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Food. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html> (acessada em 11/12/2010).
7. Wang, J. Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. Mass Spectrom. Rev. 2009, 28, 50-92.

Capítulo I.

Análise de resíduos de macrolídeos em alimentos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas – aspectos analíticos e regulatórios - uma revisão.

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Química Nova*

Análise de resíduos de macrolídeos em alimentos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas – aspectos analíticos e regulatórios – uma revisão.

Abstract

This is an overview on recent techniques applied for macrolides determination in food, including sample preparation and method validation, and the policies adopted by international agencies regarding their presence in food.

Techniques for the analysis of macrolides in food normally include solid phase or liquid-liquid extraction followed by HPLC. UHPLC presents advantages in running time, detectability and solvent consumption.

Triple quadrupoles are the most common instruments used in the determination of contaminants in food, but time of flight and ion trap spectrometers have been successfully applied when the analysis focuses on the investigation of structural formula or the presence of degradation products.

Keywords: macrolides, mass spectrometry, liquid chromatography.

Introdução

Os antimicrobianos são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, podendo ser utilizados na produção animal para (a) tratar enfermidades (terapêutico), (b) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático), e (c) melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento). Uma grande variedade de substâncias antimicrobianas é usada na produção animal em todo o mundo. A presença de resíduos dessas substâncias em produtos alimentícios pode representar risco à saúde dos consumidores sendo, portanto, um ponto crítico sobre o uso de medicamentos veterinários em animais de produção. Essa questão é ainda mais importante, quando se considera o potencial uso incorreto dessas substâncias por parte dos produtores. O uso dessas substâncias em sistemas de criação de animais destinados à produção de alimentos deve seguir as Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, recomendações oficiais e autorizadas para o uso desses compostos, aprovadas por autoridades nacionais, que incluem a espécie animal a que se destinam; a dose e o período de tratamento; e o período mínimo de suspensão do medicamento que antecede o abate dos animais, denominado período de carência.

O mau uso de antimicrobianos pode levar à seleção de formas resistentes de microrganismos em relação ao agente ativo da substância utilizada, tema esse de grande importância quanto ao potencial de risco à saúde humana. Os resíduos de antimicrobianos podem, ainda, apresentar efeitos tóxicos destacando-se a carcinogênese, mutagênese, teratogênese e a hipersensibilidade.^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Segundo Mellon *et al.*, estima-se que nos Estados Unidos cerca de 70% da produção anual de antibióticos (considerando um total de 16000 ton.) tem sido utilizada na pecuária com fins não terapêuticos.⁷

Dentre as diferentes classes de antimicrobianos, destacam-se os macrolídeos por serem altamente potentes contra uma grande variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. A organização Mundial para a saúde animal (OIE) considera alguns macrolídeos (eritromicina, espiramicina, tilmicosina, tilosina) como criticamente importantes na pecuária de bovinos, suínos e aves, já que existem poucos tratamentos alternativos para algumas doenças que atingem estas espécies.⁸

A presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal é uma questão de grande interesse dos órgãos governamentais responsáveis pela saúde pública, das indústrias de alimentos e dos consumidores, frente às questões da segurança alimentar e da resistência bacteriana. Sendo o Brasil um país de expressiva atividade pecuária no cenário mundial, é fundamental que estejam em vigor eficientes programas que garantam a qualidade de alimentos desta origem. Para atender a essa demanda, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que possibilitem a determinação de medicamentos veterinários em níveis residuais (na ordem de ng.g^{-1}), com potencial tóxico para a saúde humana e ao meio ambiente.

Objetivo

Este artigo tem como objetivo apresentar uma revisão sobre as técnicas analíticas mais recentes aplicadas para a quantificação e confirmação da presença de resíduos de macrolídeos em alimentos, incluindo métodos utilizados na etapa de preparo das amostras, análise cromatográfica assim como a validação das metodologias. Entre os detectores empregados, os espectrômetros de massas são destacados, visto apresentarem vantagens com relação à detectabilidade, à seletividade, além de apresentarem recursos para fornecer informações estruturais dos analitos.

Os aspectos regulatórios, bem como os limites máximos de resíduos (LMR) de macrolídeos em alimentos de origem animal aplicados pelas agências reguladoras de vários países também são abordados.

Macrolídeos: Produção, características químicas e aplicações na medicina veterinária.

Quimicamente, os macrolídeos são moléculas lipofílicas constituídas por uma lactona macrocíclica com 14, 15 ou 16 carbonos ligadas a moléculas de açúcares (desosamina, cladinose, micaminose, micarose, micosamina) através de ligações glicosídicas, podendo apresentar caráter básico. Os macrolídeos clinicamente mais eficientes são classificados em grupos, baseando-se no número de carbonos do grupo lactona. A eritromicina, a roxitromicina e a claritromicina pertencem ao grupo de 14 carbonos; a azitromicina ao grupo de 15 carbonos; enquanto que a espiromicina, josamicina, tilmicosina e a tilosina ao grupo de 16 carbonos.⁹ A azitromicina, a claritromicina e a roxitromicina são derivadas da eritromicina. A tilmicosina é sintetizada a partir da tilosina. Em geral, os macrolídeos apresentam pKa entre 7,1 e 9,9.¹⁰ Alguns macrolídeos são sensíveis a baixo pH e sofrem degradação em condições ácidas.¹

A eritromicina é um dos macrolídeos mais importantes. Produzida por fermentação por uma cepa do *Streptomyces erythraeus*, seu componente predominante é a eritromicina A. Dependendo das condições de fermentação e purificação, outras substâncias como as eritromicinas B, C, D, E e F, a N-dimetileritromicina, e o N-óxido de eritromicina A podem estar presentes em pequenas quantidades (figura 1).^{9, 11, 12}

Na medicina veterinária, a eritromicina é usada em uma vasta gama de aplicações como: tratamento de mastite clínica e subclínica em gado leiteiro, contra doenças infecciosas causadas por bactérias sensíveis a eritromicina em gado, ovinos, suínos e aves e doenças respiratórias crônicas causadas por micoplasma em aves.¹³ Na aquicultura, a eritromicina tem sido

empregada para tratar infecções contra cocos gram-positivos como o *Lactococcus garvieae* em trutas,¹⁴ como terapia contra várias infecções em peixes com fins alimentícios e ornamentais, e para controlar a doença renal causada pelo bacilo *Renibacterium salmoninarum* em salmonídeos.¹⁵ A eritromicina é biotransformada através da perda de uma molécula de água, resultando em um produto de biodegradação sem atividade antimicrobiana.

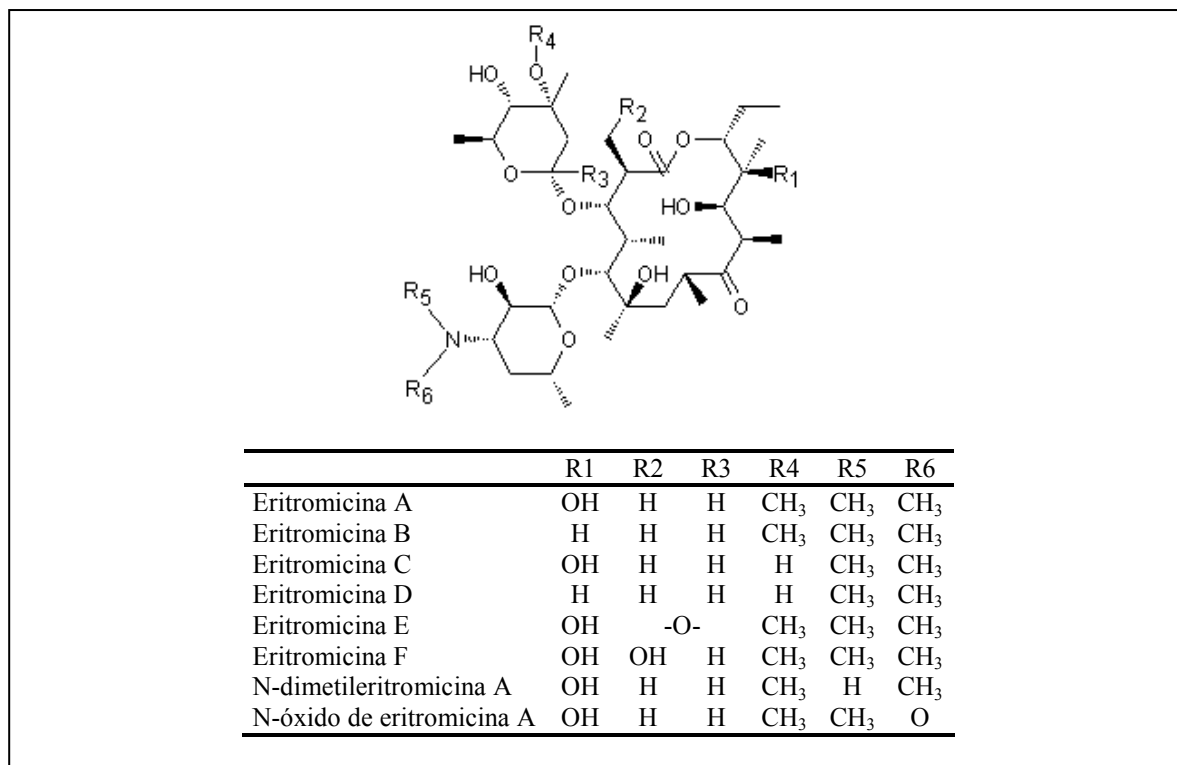


Figura 1. Estrutura molecular da eritromicina e seus compostos relacionados.

A espiramicina é produzida por algumas cepas de *Streptomyces ambofaciens* e consiste de uma mistura natural de três componentes: a espiramicina I, II e III, dos quais a espiramicina I está presente em maior quantidade.¹³ Seu espectro de ação é similar ao dos outros macrolídeos, e ela é utilizada no tratamento e controle de várias infecções bacterianas e micoplasmiais em animais. Um de seus produtos de biodegradação é a neoespiramicina, cuja atividade antimicrobiana corresponde a 88% da atividade da espiramicina. Segundo a regulamentação europeia, os resíduos marcadores para a espiramicina são a espiramicina e neoespiramicina

para gado e frango e a espiramicina I para suínos.¹³ A figura 2 mostra as estruturas moleculares da espiramicina e da neoespiramicina.

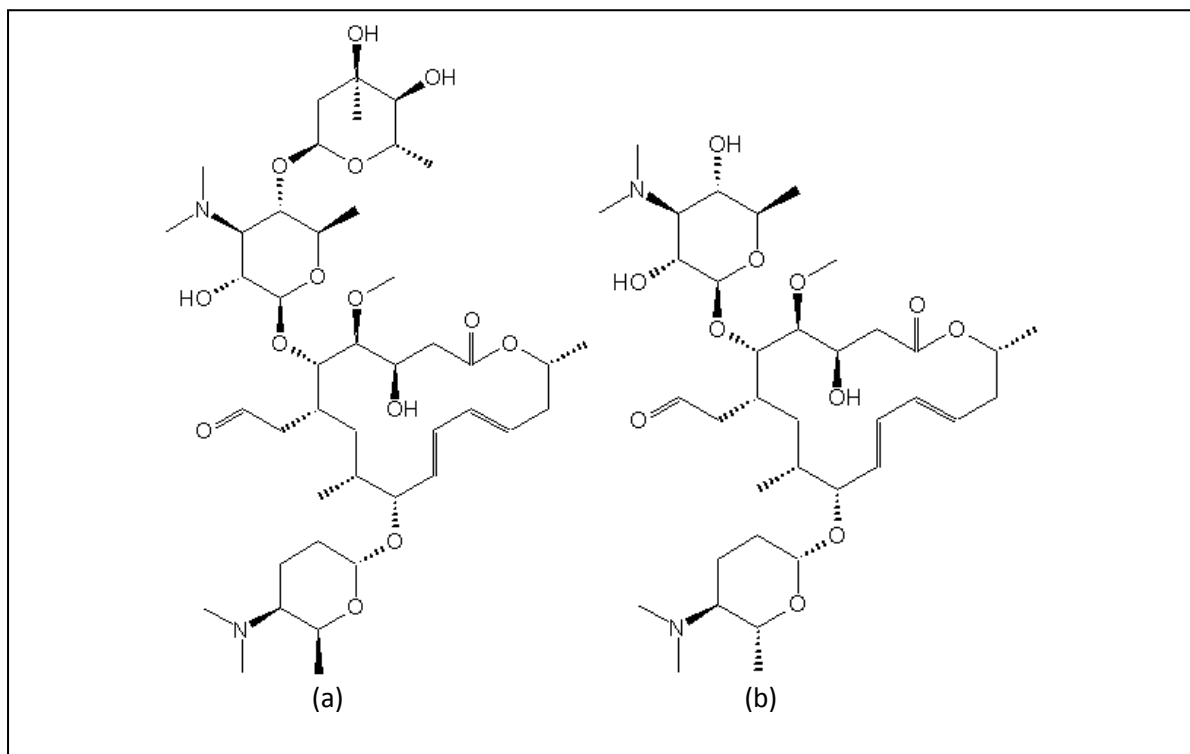


Figura 2. Estruturas moleculares da espiramicina (a) e da neoespiramicina (b).

A tilosina é produzida pelo *Streptomyces fradiae* e é ativa contra algumas bactérias gram-positivas, gram-negativas, e micoplasmas gram-positivos. Sendo exclusivamente usada na medicina veterinária, ela tem sido aplicada no tratamento de pneumonia e metrite em gado, erisipelas, pneumonia, enteropatia prolífera (ileíte) e disenteria em suínos assim como doenças respiratórias em aves.^{16, 13} O composto de maior predominância é a tilosina A, mas quantidades variáveis de desmicosina (tilosina B), macrocina (tilosina C) e relomicina (tilosina D) também estão presentes em sua composição (figura 3). A atividade antimicrobiana é principalmente devida à tilosina A, enquanto que as tilosinas B, C e D têm em torno de 50%, 70% e 30% da atividade antimicrobiana da tilosina A, respectivamente.¹⁷ A tilosina A degrada-se gradualmente a tilosina B em condições ácidas e, apesar de ser considerada o resíduo marcador,

a presença dos outros tipos de tilosina pode levar a uma diferença de 15% na quantificação de seus resíduos totais.^{17, 18}

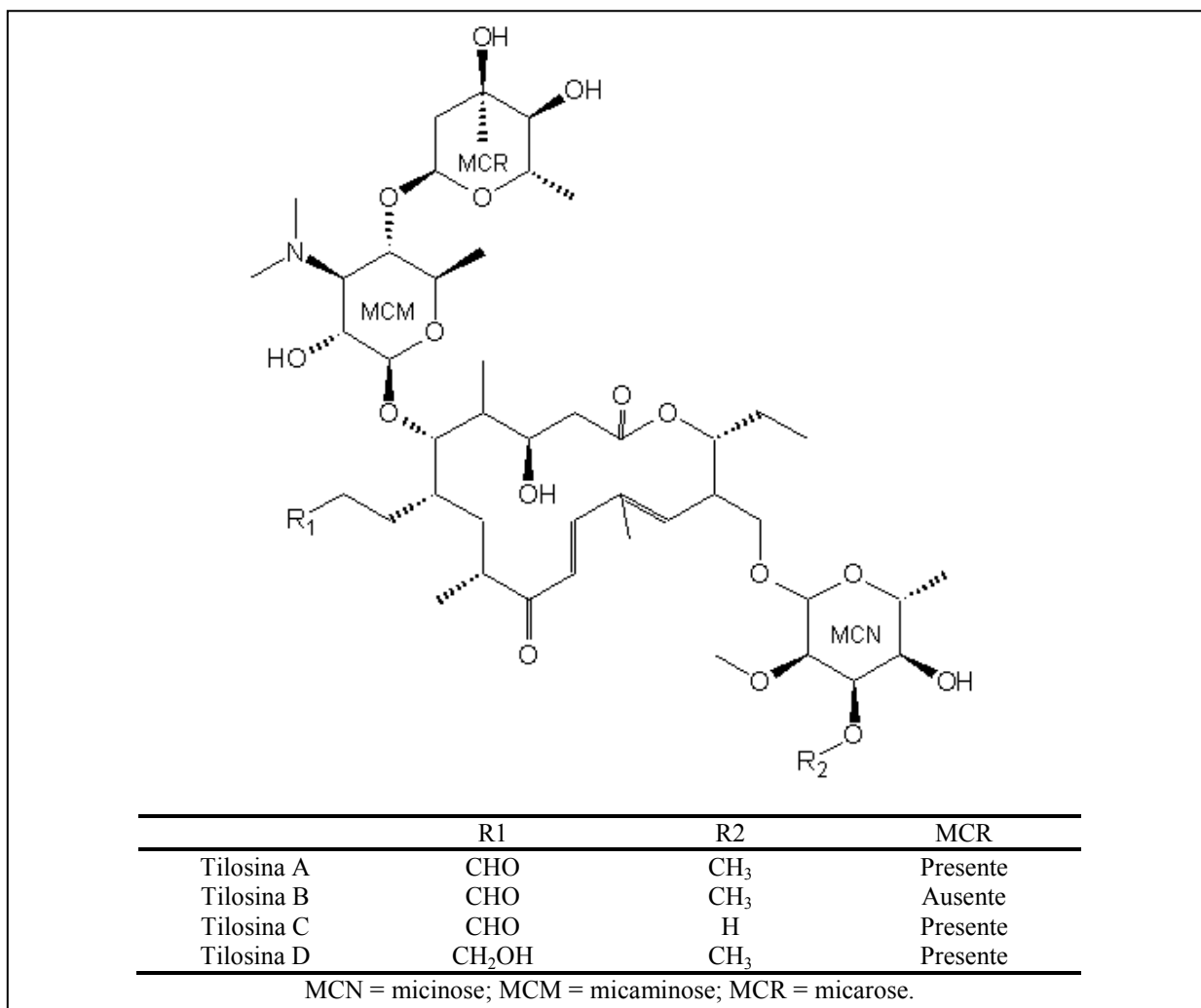


Figura 3. Estruturas moleculares da tilosina A e seus compostos relacionados.

A tilmicosina é um macrolídeo semi-sintético derivado da tilosina. Ela tem um espectro de ação similar ao da tilosina, mas com maior potência contra *Pasteurella multocida* e *Pasteurella haemolytica*, e tem sido usada no tratamento e controle de doenças respiratórias em bezerros, suínos, ovinos, frangos de corte, coelhos, e perus, também sendo indicada na prevenção de mastite durante o período de secagem do leite em gado leiteiro. A figura 4 mostra a estrutura molecular da tilmicosina.¹³

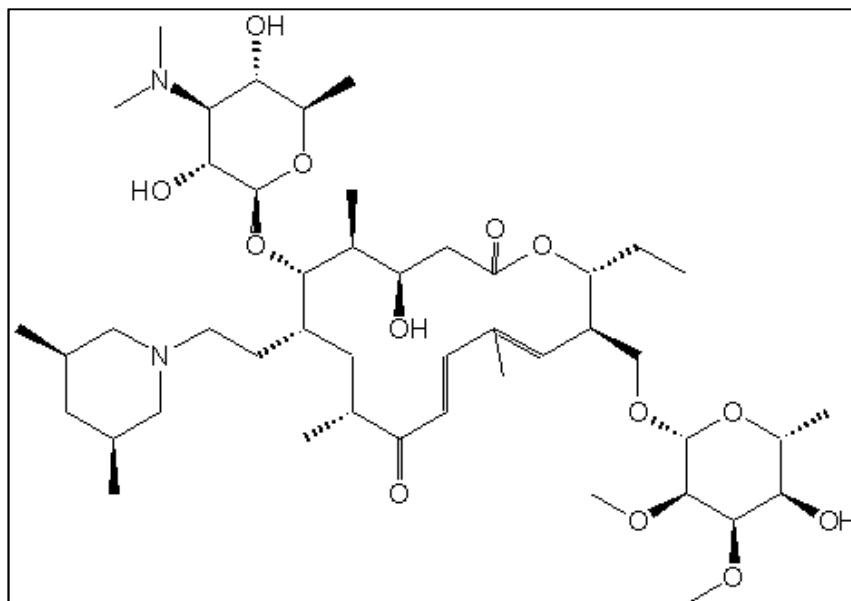


Figura 4. Estrutura molecular da tilmicosina

Métodos analíticos

Preparo de amostras

O adequado preparo de amostras é importante na detecção e na quantificação de resíduos de medicamentos veterinários por espectrometria de massas (MS) em alimentos, já que a complexidade deste tipo de matriz pode dificultar o procedimento analítico devido à supressão de íons, à formação de adutos e outros efeitos.¹⁹ Por outro lado, o emprego de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high performance liquid chromatography*) associada à espectrometria de massas geralmente requer um preparo de amostra menos elaborado, quando comparado à HPLC com detecção ótica, uma vez que os instrumentos empregados são dotados do recurso de cromatograma de massa extraída, que só não garante a seletividade cromatográfica quando ocorre coeluição com um interferente de mesma massa molar do analito.

O preparo de amostra para determinação de macrolídeos engloba a extração dos analitos, limpeza do extrato e concentração antes da análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS) propriamente dita.

O tratamento de matrizes alimentícias geralmente requer procedimentos para a desproteínização, remoção de gordura e açúcares. As técnicas mais utilizadas nestas etapas são a extração em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE) e a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* – LLE). No entanto, a extração líquida pressurizada (*pressurized liquid extraction* – PLE), a micro-extração em fase sólida (*solid phase micro extraction* – SPME), a dispersão da matriz em fase sólida (*matrix solid phase dispersion* - MSPD) e a simples diluição também têm sido empregadas. O tipo de preparo de amostra depende principalmente dos macrolídeos em questão, das matrizes envolvidas e dos objetivos específicos da análise.

A extração em fase sólida apresenta vantagens como a limpeza eficiente dos extratos, a remoção de interferentes e a redução do efeito matriz. Além disso, esta técnica permite a concentração dos analitos, melhorando a sensibilidade do método. A extração em fase sólida é realizada passando extratos aquosos através de cartuchos que contém de 30 a 500 mg de fase estacionária, adequadamente encaixados em uma caixa de distribuição de vácuo (*manifold*). Já que os macrolídeos apresentam características lipofílicas, eles são normalmente retidos em fases estacionárias hidrofóbicas e, após lavagem com água ou tampão, são eluídos com poucos mililitros de um solvente orgânico apropriado, como metanol ou acetonitrila, que podem ser evaporados e concentrados a um volume adequado para injeção no sistema cromatográfico.²⁰ O frequente uso de tampões básicos nesta etapa baseia-se nas características básicas de algumas moléculas de macrolídeos, para que permaneçam na forma não ionizada durante a extração em fase sólida, o que garante sua afinidade pela fase estacionária.

Algumas fases estacionárias já estudadas para este fim são: HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) (Waters), Strata-X® (Phenomenex), octadecilsilano (C₁₈), sílica derivatizada com 2,3 dihidroxipropoxipropil (Bond-Elut diol®, Varian), troca catiônica com ácido benzenosulfônico (Bond-Elut SCX®, Varian). Os cartuchos HLB, constituídos de um sorvente de fase reversa feito com um copolímero de N-vinilpirrolidona hidrofílica e divinilbenzeno lipofílico, são normalmente preferidos devido a sua boa capacidade de retenção e a recuperação reprodutível de compostos em uma ampla faixa de polaridade, sejam eles ácidos, básicos ou neutros. Os cartuchos Strata-X® são compostos de um polímero de estireno divinilbenzeno com superfície modificada, e apresentam funcionalidade similar ao HLB na retenção de macrolídeos. Os macrolídeos são bem retidos em cartuchos HLB e permitem a lavagem com até 40% de metanol sem perdas significativas.²¹

Na literatura científica encontram-se exemplos onde, para extrair macrolídeos de mel, amostras (5 g) são dissolvidas em tampão fosfato (0,1 M, pH 8),^{22, 23, 24, 25} tampão tris (0,1M, pH 10,5)²⁶; ou tampão Na₂CO₃/NaHCO₃.^{17, 27} Após um tratamento inicial envolvendo filtração e centrifugação para remover lipídeos e resíduos sólidos, os extratos passam pela extração em fase sólida para remover açúcares, pigmentos e compostos fenólicos do mel e para concentrar os macrolídeos. Para a extração de macrolídeos de tecidos animais, ovo e leite, amostras de 1 a 5 g são primeiramente desproteinizadas e desengorduradas. A desproteinização é usualmente realizada com solventes orgânicos, como acetonitrila, em quantidades 3 a 5 vezes superiores à quantidade de amostra.^{14, 22, 28, 29, 21, 30, 31, 32} Os extratos são posteriormente desengordurados com hexano e submetidos à extração em fase sólida, onde ocorrem a remoção de interferentes e a concentração dos analitos.

Pode-se citar também a extração de espiramicina e tilosina de ração animal, onde 2,5 g de amostra foram submetidos à extração com 10 mL de metanol 70:30 com 2% de ácido

fórmico. O extrato foi diluído em água (1:9, v/v) antes da extração com cartuchos HLB, de onde os analitos foram extraídos com 2 mL de água:acetonitrila 1:1 (v/v), após a secagem a vácuo do cartucho. A etapa de SPE eliminou a etapa lenta de evaporação do metanol.^{33, 31, 34} A tilosina forma um complexo com a ureia presente em algumas rações bovinas e, neste caso, utiliza-se a enzima uréase para hidrolisar esta substância e liberar a tilosina do complexo, procedimento necessário para o método atingir valores aceitáveis de recuperação e precisão.³⁴

A combinação de extração em fase sólida com extração líquido-líquido tem se mostrado efetiva para a extração de macrolídeos. Na análise de eritromicina em salmões, um tampão de formato de amônio (10 mM), ao invés de solventes orgânicos, foi utilizado na primeira etapa, que foi seguida de extração em fase sólida com HLB e de extração líquido-líquido com cloreto de metileno. Embora este método elimine as etapas de precipitação de proteínas e remoção de lipídeos antes da extração em fase sólida, a extração líquido-líquido ao fim do preparo de amostra confere uma limpeza efetiva do extrato.³⁵ Em outra aplicação, tampão fosfato foi adicionado aos tecidos homogeneizados, e a mistura foi particionada com clorofórmio para a extração líquido-líquido, que foi seguida de extração em fase sólida com Bond-Elut® (Varian) diol para extrair eritromicina, tilmicossina e tilosina de tecidos bovinos.³⁶

Uma técnica relativamente barata e ecologicamente correta, reportada para extrair tilosina, tilmicossina, espiramicina, eritromicina e eritromicina anidra de iogurte e leite, usa a técnica de MSPD e água como solvente de extração. Uma amostra de 1,5 ml ou g foi dispersa em 5 ou 6 g de areia, que serviu como material de suporte, e misturada. A mistura foi então empacotada em uma coluna de MSPD e os macrolídeos eluídos com água a 70 °C acidificada com ácido fórmico a pH 4,6 e o extrato final foi ajustado para pH 6 antes da injeção no sistema LC-MS.³⁷ O método apresentou boa detectabilidade com limites de detecção abaixo de $\mu\text{g kg}^{-1}$,

muito embora deva-se atentar para a questão da instabilidade da eritromicina em condições ácidas.

A simples diluição do extrato, antecedendo a injeção cromatográfica, pode se mostrar útil em métodos onde se deseja extrair analitos de diferentes classes, exemplo no qual a seletividade da extração em fase sólida pode ser uma desvantagem. Muito embora a diluição reduza o efeito matriz, este método pode não atingir os limites de detecção e quantificação requeridos. Além disso, se faz necessária a constante e extensiva manutenção do sistema LC-MS (regeneração e troca da coluna cromatográfica, limpeza da fonte de ionização e lentes do espectrômetro de massas), para garantir a sensibilidade do sistema e a reprodutibilidade dos cromatogramas.²⁰ Como exemplo, amostras de mel (2 g) foram misturadas e diluídas cinco vezes com uma mistura de água e acetonitrila (70:30), filtradas e o injetadas no sistema LC-MS. Uma válvula de desvio foi utilizada para direcionar o fluxo para o descarte antes e depois da eluição dos analitos como o objetivo de minimizar a contaminação da fonte de ionização. Um solvente mais apolar (acetato de etila) foi adicionado ao final do gradiente para remover da coluna resíduos de mel que não seriam eluídos com acetonitrila.^{38, 39}

Num outro caso, macrolídeos e outros antibióticos, num total de 19 substâncias, foram extraídos de músculo e fígado de suínos, bovinos e equinos com metanol 70%; com posterior diluição em cinco vezes com água e injeção no sistema LC-MS. Este método foi adequado para monitorar os antibióticos nestas matrizes, e conseguiu detectar macrolídeos com relação sinal-ruído maior que oito em LMR de 50 a 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.³² Um terceiro exemplo envolve a análise de eritromicina em trutas onde 1 g de amostra foi misturada com água (1 mL), com consecutivas extrações com 4 e 5 mL de acetonitrila seguida de agitação e ultra-som. Após a centrifugação a 10.000 g, os sobrenadantes foram combinados, o extrato foi desengordurado

com hexano, filtrado e analisado por LC-MS. Deve-se ressaltar que este método visava atingir níveis de concentração a 0,5; 1; e 1,5 vezes o LMR da eritromicina nos EUA, de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$.¹⁴

Separação cromatográfica

A separação cromatográfica de macrolídeos baseia-se em suas características lipofílicas, com o uso de colunas de fase reversa. Na maioria dos casos colunas convencionais de fase estacionária de sílica porosa ligada a octadecilsilano (C18) são utilizadas, mas recentemente colunas para UHPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência) com partículas inferiores a 2 μm têm sido aplicadas na separação destes analitos. As análises por UHPLC são muito mais rápidas, consomem menos solvente, apresentam eficiência mais elevada e detectabilidade cerca de duas a três vezes maior quando comparada a HPLC.⁴⁰ A UHPLC e outras técnicas de cromatografia rápida com partículas menores que 2 μm são métodos de separação inovadores que tem crescido em popularidade e oferecem vantagens significativas na resolução, na velocidade e na sensibilidade cromatográficas, principalmente quando acoplados a espectrômetros de massas capazes de adquirir dados a alta velocidade.⁴¹ Ainda que existam poucos relatos de sua utilização na literatura, existe uma tendência de mudança de HPLC para UHPLC e outras técnicas de cromatografia rápida para a separação de macrolídeos em matrizes alimentícias, biológicas e ambientais, devido às vantagens explicitadas.^{42, 43, 20}

A composição, a concentração dos modificadores e o pH da fase móvel são fatores críticos para se aperfeiçoar tanto a separação quanto a ionização dos macrolídeos. Metanol e acetonitrila são os solventes orgânicos mais utilizados em HPLC e UHPLC, e ácido fórmico ou acético a 0,1% ou acetato de amônio 10-20 mM são os modificadores mais comuns.²⁰ Ácidos carboxílicos perfluorados podem ser eventualmente utilizados como pares iônicos hidrofóbicos para melhorar a forma dos picos cromatográficos.^{44, 27} No entanto, é sabido que pares iônicos

podem causar supressão iônica no caso da ionização por eletronebulização (ESI), devido à pareação iônica durante o processo de ionização na fonte, provocando perdas significativas no sinal analítico, especialmente em compostos que tem nitrogênio presente em suas moléculas. Portanto, pares iônicos devem ser evitados sempre que possível na análise de traços de macrolídeos.²⁰

Técnicas de detecção

Métodos analíticos para a determinação de macrolídeos em várias matrizes envolvem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção ótica, eletroquímica, ou associada à espectrometria de massas (LC-MS).^{9, 44, 45}

A detecção por ultravioleta tem sido usada para a determinação de espiramicina, tilosina e tilmicosina devido às suas duplas ligações conjugadas, que servem como cromóforos com pico de absorbância em 232 ou 287 nm.⁴⁵ A eritromicina e seus derivados semi-sintéticos não possuem duplas ligações conjugadas e não são bem detectados em baixas concentrações, e ainda que comprimentos de onda de 210 ou 215 nm tenham sido utilizados para a análise deste grupo de macrolídeos, sua detecção sofre a interferência de outros compostos que também absorvem nestes comprimentos de onda.⁹ A detecção fluorimétrica com aplicação de derivatização química tem sido usada para melhorar a sensibilidade na quantificação destes compostos.^{44, 46, 47, 48} Os macrolídeos possuem grupamentos eletroativos e a detecção eletroquímica tem se mostrado eficaz e sensível na detecção de eritromicina e outros macrolídeos.^{44, 49} No entanto, quando se deseja determinar macrolídeos e confirmar sua identidade em uma única análise, técnicas de detecção ótica ou eletroquímica não são suficientes.²⁰

Espectrometria de massas

As vantagens da espectrometria de massas para a detecção de macrolídeos em amostras alimentícias, biológicas e ambientais residem nas suas características inigualáveis de detectabilidade, seletividade e capacidade de identificação através do fornecimento de informações estruturais. Dentre as possíveis aplicações da espectrometria de massas para a análise de macrolídeos estão: (a) o estudo farmacocinético ou da cinética de depleção destes fármacos e o monitoramento de sua eficácia para uso humano e veterinário;^{36,51, 52, 53, 54, 55} (b) a elucidação estrutural dos macrolídeos, das impurezas e produtos de degradação;^{11, 12, 22, 56} (c) a garantia da segurança dos consumidores através da determinação de seus resíduos em alimentos, facilitando o comércio internacional de alimentos;^{21, 22, 23, 28, 29, 30, 57, 58} (d) a detecção de tilosina e espiramicina em ração animal, já que o uso destes fármacos como promotores de crescimento foi banido na União Europeia;^{33, 59, 60} e (e) a investigação da ocorrência de macrolídeos em amostras ambientais.^{61, 62, 63, 64}

A espectrometria de massas vem sendo largamente utilizada nas áreas biológica e alimentícia devido a algumas características da técnica tais como: (a) alta detectabilidade – concentrações baixas de substâncias podem ser detectadas e analisadas; (b) baixo volume de amostra – o uso de interfaces apropriadas para pequenos volumes permite que se use quantidade de amostras muito pequenas; (c) possibilidade de interfaceamento com técnicas de separação – a utilização de misturas água/solvente na ionização faz com que ela seja ideal para o acoplamento de sistemas de separação como HPLC.⁶⁵

Ionização

Das diversas técnicas de ionização em espectrometria de massas, duas tem ganhado destaque: a ionização por eletronebulização (ESI – *electrospray ionization*) e a ionização

química a pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionization*). Tanto ESI como APCI são técnicas brandas de ionização, que possibilitam a protonação ou a desprotonação de moléculas, facilitando assim a identificação dos compostos, sem a obrigatoriedade do uso de bibliotecas de espectros.

A ionização por ESI ocorre ao se aplicar um potencial elétrico ao eluente quando ele percorre o capilar do nebulizador, resultando na emergência de um aerossol de gotas carregadas. Estas gotas sofrem uma redução de tamanho até atingir uma densidade de carga suficiente para permitir que os íons da amostra sejam expulsos da superfície da gota (evaporação iônica). Geralmente, compostos com menos de 1000 Da produzem íons protonados com carga única ($[M+H]^+$) no modo positivo ou no modo negativo ($[M-H]^-$) de ionização, dependendo da estrutura do composto. A fonte de ESI pode ser ajustada (através do “tunning”) para fragmentar os íons durante a ionização. Este recurso pode fornecer informações valiosas sobre a estrutura de analitos de baixo peso molecular. Em espectrômetros do tipo QToF ou QqQ promove-se a fragmentação na célula de colisão, o que permite a confirmação da identidade do composto, já que a relação m/z do íon precursor é conhecida.⁶⁶ A ESI é aplicável a compostos com polaridade média a alta, por isso tem se tornado a técnica padrão no interfaceamento entre cromatógrafos líquidos e espectrômetros de massa.⁶⁷

Na ionização por APCI a amostra é evaporada em um nebulizador aquecido antes de emergir a um plasma constituído de íons do solvente gerados na fonte por uma descarga corona. A transferência ou abstração de prótons ocorre entre os íons do solvente e a amostra. A habilidade de operar com fases móveis 100% orgânicas ou 100% aquosas a fluxos de até 2 mL.min⁻¹ torna a APCI uma técnica ideal para uso com colunas cromatográficas convencionais com fases estacionárias normais ou reversas.⁶⁶ Apesar da predominância do uso de ESI na

análise de macrolídeos por LC-MS, a APCI tem sido usada em algumas aplicações, e demonstrado alguma vantagem com relação à redução do efeito matriz.^{68, 69, 70}

Especialmente quando se trata de fontes ESI, o efeito matriz deve ser considerado em análises quantitativas por LC-MS. Os componentes da matriz podem tanto melhorar como suprimir o sinal dos analitos e seu efeito pode variar de amostra para amostra. O efeito matriz pode ser estimado comparando-se o sinal dos analitos em solvente com seu respectivo sinal na presença da matriz, através da adição de seus padrões analíticos no extrato, após todo o processo de tratamento de amostra.⁷¹

O uso de padrões internos isotópicos estáveis, curvas analíticas na matriz (“matrix-matched”) e a adição de padrão são as abordagens mais comuns para compensar o efeito matriz e melhorar a exatidão do método. Como existem poucos padrões de macrolídeos deuterados no mercado, a quantificação através da curva analítica na matriz, com ou sem a adição de um análogo químico como padrão interno, como por exemplo a roxitromicina, tem sido a abordagem mais usada.²⁰ Apesar de efetiva, esta técnica é trabalhosa, já que todo o processo de preparo de amostra é necessário a cada replicata na preparação dos padrões para a construção da curva analítica.⁶¹

Os macrolídeos contêm nitrogênio em suas moléculas e são facilmente protonáveis a íons com carga simples, dupla ou tripla em fontes ESI no modo positivo.²⁰ O número de cargas possíveis de serem acomodadas nas moléculas está relacionado ao número de nitrogênios presentes nas mesmas. Moléculas com um nitrogênio, como eritromicina e tilosina formam apenas íons monoprotonados ($[M+H]^+$). Espiramicina, neoespiramicina, tilmicosina e roxitromicina, que contêm dois nitrogênios em suas moléculas, formam também íons com dupla carga ($[M+2H]^{2+}$). Tanto íons monoprotonados com os com dupla carga têm sido utilizados para aquisição de dados na análise de macrolídeos.^{3, 52, 72}

Espectrômetros de massa

Alguns dos espectrômetros de massa que têm sido utilizados para análise de macrolídeos são o quadrupolo simples (Q), o triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo – armadilha de íons (QIT – *quadrupole – ion trap*), quadrupolo - armadilha de íons linear (QLIT – *quadrupole – linear ion trap*), tempo de voo (ToF – *time of flight*) e quadrupolo-tempo de voo (QToF – *quadrupole – time of flight*). Cada um deles apresenta diferentes performances, funções, vantagens e desvantagens que serão brevemente discutidas a seguir.

Quadrupolo simples (Q)

Este espectrômetro de massas consiste em quatro hastes metálicas hiperbólicas paralelas. Seu mecanismo de funcionamento se dá através da aplicação de uma corrente elétrica específica em cada uma delas e da imposição de uma radiofrequência que criam um campo elétrico capaz de estabelecer uma trajetória para íons com razão massa/carga (m/z) específica, funcionando então como um “filtro de massa”. O quadrupolo simples pode operar no modo de rastreamento total (*full scan mode*) ou de monitoramento de íon selecionado (*selected ion monitoring*). Apesar de ter aplicabilidade demonstrada na detecção e quantificação de macrolídeos, a falta de especificidade deste tipo de espectrômetro fez com que ele fosse substituído por espectrômetros de massa conjugados ou com melhor resolução de massa.⁷³

Triplo quadrupolo

Este é sem dúvida o espectrômetro de massas mais usado na análise de resíduos de macrolídeos devido ao seu desempenho incomparável na quantificação no que diz respeito à faixa dinâmica, à repetibilidade e à sensibilidade. Ele é composto por um primeiro quadrupolo (Q1), uma cela de colisão (Q2) e o terceiro quadrupolo (Q3), podendo ser operado em quatro modos com dissociação induzida por colisão (CID - *collision-induced dissociation*): (a)

varredura do íon produto (*product ion scan*): consiste em selecionar um íon precursor de certa massa/carga (m/z) e determinar todos os íons-produto resultantes da dissociação; (b) varredura do íon precursor (*precursor ion scan*): consiste na escolha de um íon-produto para determinar seu íon precursor, este modo requer que o íon-produto seja focalizado no segundo quadrupolo enquanto o primeiro o rastreia a relação massa-carga do íon precursor, assim todos os íons precursores que produzam íons daquela massa-carga, serão detectados; (c) varredura de perda neutra (*neutral loss*): consiste em selecionar um fragmento neutro e detectar todas as fragmentações que levariam a perda deste fragmento; este modo requer que os dois analisadores procedam a varredura juntos, com uma diferença de massa constante entre eles; e (d) monitoramento de reações selecionadas (SRM - *selected reaction monitoring*): consiste em selecionar uma reação de fragmentação; neste modo tanto o primeiro quanto o segundo analisadores são focalizados nas massas selecionadas, não havendo varredura, o que aumenta a sensibilidade para o monitoramento, associada ao aumento na seletividade.⁷⁴

O modo mais comumente utilizado na quantificação é o SRM. Em geral faz-se uma primeira aquisição com o padrão da substância em questão, para selecionar as transições SRM que serão usadas na análise por LC-MS. Existe um consenso entre os vários pesquisadores sobre as transições avaliadas, no entanto há diferenças nas abundâncias relativas entre os íons, devido às diferenças no desenho dos espectrômetros entre os fabricantes, ainda que sejam do mesmo tipo.

O modo de varredura do íon precursor pode ser particularmente útil para identificar contaminantes em matrizes complexas como os alimentos. Em um caso específico, este tipo de análise propiciou a identificação da presença de eritromicina B em iogurte. Um espectrômetro QqQ foi operado no modo de varredura do íon precursor com monitoramento do fragmento com m/z 158 no Q3, que é típico de impurezas comumente presentes na eritromicina A. Foi

então encontrado um íon precursor de m/z 718 no Q1. Aprofundando a investigação, foram realizadas análises nos modos de varredura do íon produto e de monitoramento de reações selecionadas e este composto foi confirmado como a eritromicina B, uma impureza resultante do processo de fermentação para produção da eritromicina.³⁴

Quadrupolo – “Ion Trap” (QIT)

Este espectrômetro de massas possui um quadrupolo e um *ion-trap* constituído por três eletrodos, um em forma de anel que fica entre os outros dois, que têm formato hiperbólico e são isolados nas pontas. A diferença de potencial oscilante entre o anel e os eletrodos hiperbólicos gera um campo magnético capaz de confinar ou deixar passar os íons.^{75, 76} Este tipo de analisador tem a característica única de conduzir fragmentações em múltiplos estágios (MS^n). Quando os íons entram no *ion-trap*, todas as fragmentações ocorrem no mesmo local, mas em tempos diferentes, apresentando uma melhor sensibilidade na varredura do que os QqQ, mas com a limitação de não realizar aquisições alternadas entre os modos de varredura do íon produto e de varredura de perda neutra.^{75, 77} Além disso, estes instrumentos são menos robustos para análise de matrizes mais complexas e podem apresentar baixa repetibilidade e faixa dinâmica muito estreita para a quantificação.⁷⁸ Instrumentos do tipo QIT têm sido usados para caracterizar os padrões de fragmentação de macrolídeos como a azitromicina. Estes experimentos geraram espectros ricos, esclarecedores da estrutura dos macrolídeos em questão, revelando também impurezas em amostras comerciais destes fármacos desconhecidas até então.

11, 12, 56, 78, 79

Triplo-quadrupolo -“ion-trap” linear (QLIT)

Este espectrômetro de massas baseia-se no mesmo tipo de configuração que o QqQ, onde o Q3 pode ser operado tanto como um filtro de massas convencional quanto como um “ion-trap” com ejeção axial de íons.^{80, 81} O QLIT agrupa as vantagens do QqQ e do QIT sem

perda de desempenho com relação a seus precursores, podendo ser operado nos mesmos modos que o QqQ, ainda possuindo a habilidade de acúmulo de íons para realizar análises com fragmentações múltiplas para elucidação estrutural. Ele também possui um recurso de varredura de íon fragmento avançada, onde os íons fragmento são acumulados no “ion-trap” possibilitando o aumento de sensibilidade na varredura, o que o torna ideal para análises onde se deseja quantificar e confirmar a identidade de compostos de que possuem padrões de fragmentação pobres.^{77, 20}

Tempo de voo (ToF) e Quadrupolo – tempo de voo (QToF)

Neste tipo de analisador íons com a mesma energia cinética, mas com relação m/z diferentes são separados em um túnel de voo de 1 a 2 m de comprimento sem campo magnético. Instrumentos do tipo ToF são configurados como ToF simples ou híbridos de quadrupolo – tempo de voo (QToF). Este último é construído de maneira a direcionar os íons ortogonalmente do quadrupolo ao tempo de voo, através de um acelerador de íons, para análises no modo MS/MS com varredura dos íons-produto.^{82, 83} A grande vantagem destes analisadores se dá pelo fato de oferecerem informações espectrais completas com resolução de média a alta, medida de massa exata e excelente sensibilidade no modo de varredura total. Não há dúvida de que os espectrômetros QqQ e QLIT são superiores na quantificação, mas os dados adquiridos nestes analisadores são limitados à natureza das transições SRM e à massa nominal dos íons precursores e produto, desta forma, parte da informação qualitativa para elucidação estrutural e identificação de compostos é perdida. Os analisadores ToF e QToF permitem a análise de composição elementar, através medição precisa da razão m/z , e, consequentemente, a quantificação e confirmação inequívoca dos analitos, bem como a triagem e quantificação de compostos desconhecidos ou produtos de degradação. Sendo assim, analisadores do tipo ToF são ideais para a busca de compostos cuja presença é suspeita nas amostras. Estes

espectrômetros de massa têm sido utilizados em métodos de rotina para triagem de multi-resíduos de macrolídeos.^{22, 84, 85, 86, 87}

Em um estudo para a determinação de seis macrolídeos em ovos, leite integral e mel, a técnica UHPLC-QToF obteve limites de detecção (LDs) entre 0,1 e 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, adequados para atender os requisitos regulatórios em análises de rotina e identificou a desmicosina (tilosina B) em mel, baseando-se na medição de massa precisa e usando o recurso de composição elementar.²² A Tilosina A sofre hidrólise e perde uma molécula de micarose, formando a tilosina B a pH 4, que é muito próximo ao pH médio típico do mel (entre 3,4 - 6,1).¹⁸ A Análise por UHPLC-QToF permitiu a determinação da tilosina e identificação de seu produto de degradação nesta matriz, sem a necessidade de uso de um padrão analítico da tilosina B, o que seria difícil de obter com espectrômetros do tipo QqQ ou QLIT.

Este estudo ainda comparou o desempenho do método com relação à linearidade, a precisão e os limites de detecção por UHPLC-QToF e HPLC-QqQ, e demonstrou que a técnica HPLC-QqQ tem faixa linear mais ampla que a UHPLC-QToF, mesmo com o recurso de melhora de faixa dinâmica habilitado na segunda. A técnica HPLC-QqQ ainda apresentou melhor repetibilidade devido ao maior número de pontos adquiridos ao longo dos picos cromatográficos. Avalia-se que a detectabilidade de espectrômetros ToF e QToF é de uma a duas ordens de magnitude inferior aos QqQ no modo SRM.^{88, 89, 90} Desta forma a aplicabilidade da espectrometria de massas ToF ou QToF para quantificação de resíduos de contaminantes em matrizes alimentícias é um desafio, devido às baixas concentrações destas substâncias nestas amostras. A tabela 1 resume as condições de análise para quantificação de macrolídeos por LC-MS (HPLC-MS ou UHPLC-MS) em estudos recentemente reportados.

Tabela 1: Condições de análise para quantificação de macrolídeos por LC-MS ou UHPLC-MS

Matriz	Preparo de amostra		Curva analítica	Técnica cromatográfica		Substância	Espectrometria de massas			Limites		Referência
	Extração	Limpeza do extrato		Fase estacionária	Fase Móvel		m/z e/ou transições	Ionização	Instrumento	CCα ou LOD	CCβ ou LOQ	
Ovos, leite integral e mel	Desproteínização com acetonitrila e/ou extração com tampão fosfato 0,1M (pH 8,0)	HLB	Superposição da matriz: roxitromicina como padrão interno	UHPLC: Acquity BEH C18 100 x 2,1 mm 1,7 µm HPLC: AQ S-3, 50 x 2,0 mm	UHPLC: acetato de amônio 10 mM HPLC: acetonitrila e ácido fórmico 0,1%	Espiramicina	QToF : 843,5218 QqQ: 843→174, 142	ESI	QqToF e QqQ	UHPLC-QToF: 0,8 – 1,0 µg.kg ⁻¹ HPLC-QqQ: 0,1 – 0,2 µg.kg ⁻¹		22
						Eritromicina	QToF : 734,4690 QqQ: 734→158, 576					
						Neoespiramicina	QToF : 699,4432 QqQ: 699→174, 142					
						Oleandomicina	QToF : 688,4272 QqQ: 688→158, 544					
						Tilmicosina	QToF : 869,5738 QqQ: 869→174, 132					
						Tilosina A	QToF : 916,5270 QqQ: 916→174, 145					
						Tilosina B	QToF : 772,4483					
Mel	Dissolução em acetonitrila e água (3:7) seguida de injeção cromatográfica		Superposição da matriz: Roxitromicina como padrão interno	Luna C8 150 x 2 mm, 5 µm	Ácido heptafluorobutírico 0,04%, acetonitrila e acetato de etila	Tilosina A	916→174, 772	ESI	QqQ	0,4 µg.kg ⁻¹	1,5 µg.kg ⁻¹	39
						Tilosina B	772→174, 156			1,1 µg.kg ⁻¹	3,7 µg.kg ⁻¹	

Matriz	Preparo de amostra		Curva analítica	Técnica cromatográfica		Substância	Espectrometria de massas			Limites		Referência
	Extração	Limpeza do extrato		Fase estacionária	Fase Móvel		m/z e/ou transições	Ionização	Instrumento	CCα ou LOD	CCβ ou LOQ	
Leite bovino e iogurte	DMFS: Fase sólida: areia Solvente de extração: água a 70 °C		Superposição da matriz: Roxitromicina como padrão interno	Alltima C18 250 x 4,6 mm; 5µm	Ácido fórmico 10mM e metanol	Eritromicina	734→158, 576	ESI	QqQ	leite: 1,0 ng.mL ⁻¹	leite: 2,0 ng.mL ⁻¹	37
						Espiramicina	438* → 101, 174 *[M+CH ₃ OH+2H] ²⁺			iogurte: 5 ng.g ⁻¹ Leite: 2 ng.mL ⁻¹	iogurte: 8 ng.g ⁻¹ Leite: 6 ng.mL ⁻¹	
						Tilmicosina	870 → 174, 697			iogurte: 0,9 ng.g ⁻¹ Leite: 0,3 ng.mL ⁻¹	iogurte: 2 ng.g ⁻¹ Leite: 0,9 ng.mL ⁻¹	
						Tilosina	916→174, 772			iogurte: 1 ng.g ⁻¹ Leite: 1 ng.mL ⁻¹	iogurte: 2 ng.g ⁻¹ Leite: 2 ng.mL ⁻¹	
Mel	Dissolução em tampão fosfato 0,1M (pH 8,0) seguida de extração líquida com acetonitrila, ácido tricloroacético 10%; ácido nanofluoropentanóico 4% em acetonitrila; e água a 65°C		Superposição da matriz	Zorbax C18 50 x 2,1 mm, 1,8 µm	Ácido nanofluoropentanóico 1mM, ácido fórmico 0,5%, acetonitrila e metanol	Eritromicina	734→756, 158	ESI	QqLIT	CCα = 29,7 µg.kg ⁻¹	CCβ = 60,8 µg.kg ⁻¹	23
						Oleandomicina	688→158, 544			CCα = 27,4 µg.kg ⁻¹	CCβ = 41,0 µg.kg ⁻¹	
						Roxitromicina	837→158, 679			CCα = 27,8 µg.kg ⁻¹	CCβ = 43,1 µg.kg ⁻¹	
						Espiramicina	843→174, 540			CCα = 29,4 µg.kg ⁻¹	CCβ = 45,3 µg.kg ⁻¹	
						Tilmicosina	869→174, 156			CCα = 31,4 µg.kg ⁻¹	CCβ = 80,9 µg.kg ⁻¹	
						Tilosina	916→174, 156			CCα = 27,6 µg.kg ⁻¹	CCβ = 48,0 µg.kg ⁻¹	
						Tilosina B	772→174, 156			-	-	
Mel	Extração com tampão Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ 0,1M (pH 9)	Strata-X	Superposição da matriz: roxitromicina como padrão interno	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5µm	Ácido fórmico 0,1% e acetonitrila	Tilosina A	916	ESI	Q	2 µg.kg ⁻¹	9 µg.kg ⁻¹	17
						Tilosina B	772			3 µg.kg ⁻¹	9 µg.kg ⁻¹	
						Tilosina C	902			2 µg.kg ⁻¹	6 µg.kg ⁻¹	
						Tilosina D	918			2 µg.kg ⁻¹	8 µg.kg ⁻¹	

Matriz	Preparo de amostra		Curva analítica	Técnica cromatográfica		Substância	Espectrometria de massas			Limites		Referência
	Extração	Limpeza do extrato		Fase estacionária	Fase Móvel		m/z e/ou transições	Ionização	Instrumento	CC α ou LOD	CC β ou LOQ	
Ovos	Extração líquido-líquido com tampão citrato 0,1M (pH 5) e acetonitrila		Calibração externa	Puresil C18 150 x 4,6 mm, 5 μ m	Ácido fórmico 0,5%, acetato de amônio 1 mM (pH 5) e acetonitrila	Tilosina	916 \rightarrow 772, 407, 754	ESI	QIT		1 μ g.kg ⁻¹	53
Leite	Desproteínização com acetonitrila e extração com tampão fosfato 0,1 M (pH 8)	HLB	Superposição da matriz: roxitromicina como padrão interno	YMC ODS-AQ, 50 x 2 mm, 3 μ m	Ácido fórmico 0,1% e acetonitrila	Eritromicina	734 \rightarrow 158, 576			0,07 μ g.kg ⁻¹		30
						Oleandomicina	688 \rightarrow 158, 544			0,09 μ g.kg ⁻¹		
						Espiramicina	843 \rightarrow 174, 142 [M+2H] ²⁺ 422 \rightarrow 101, 142	ESI	QqQ	0,08 μ g.kg ⁻¹		
						Tilmicosina	869 \rightarrow 174, 132			0,3 μ g.kg ⁻¹		
						Tilosina	916 \rightarrow 174, 145			0,06 μ g.kg ⁻¹		
Mel	Extração com tampão TRIS 0,1M (pH 10,5)	HLB	Superposição da matriz: roxitromicina como padrão interno	Synergi Hydro-RP 150 x 2,0 mm, 4 μ m	Acetato de amônio 0,01M (pH 3,5) e acetonitrila	Eritromicina	734 \rightarrow 158, 576			CC α = 0,22 μ g.kg ⁻¹	CC β = 0,26 μ g.kg ⁻¹	26
						Josamicina	828 \rightarrow 147, 600			CC α = 0,24 μ g.kg ⁻¹	CC β = 0,26 μ g.kg ⁻¹	
						Espiramicina	843 \rightarrow 174, 318	ESI	QqQ	CC α = 1,9 μ g.kg ⁻¹	CC β = 2,1 μ g.kg ⁻¹	
						Tilmicosina	870 \rightarrow 174, 696			CC α = 0,23 μ g.kg ⁻¹	CC β = 0,25 μ g.kg ⁻¹	
						Tilosina	916 \rightarrow 174, 772			CC α = 0,22 μ g.kg ⁻¹	CC β = 0,24 μ g.kg ⁻¹	
Truta	Desproteínização com acetonitrila	Remoção de lipídeos com hexano	Superposição da matriz: Eritromicina [¹³ C ₂] como padrão interno	Symmetry C18 150 x 4,6 mm, 3,5 μ m	Acetato de amônio 1mM com 0,1% de ácido acético; acetonitrila	Eritromicina	734 \rightarrow 576, 558, 716	ESI	QqQ	CC α = 220 μ g.kg ⁻¹	CC β = 238 μ g.kg ⁻¹	14

Matriz	Preparo de amostra		Curva analítica	Técnica cromatográfica		Substância	Espectrometria de massas			Limites		Referência
	Extração	Limpeza do extrato		Fase estacionária	Fase Móvel		m/z e/ou transições	Ionização	Instrumento	CCα ou LOD	CCβ ou LOQ	
Ovos	Desproteínização com acetonitrila e extração com tampão fosfato 0,1M (pH 8)	HLB	Superposição da matriz: roxitromicina como padrão interno	YMC ODS-AQ 50 x 2,0 mm, 3 µm	Ácido fórmico 0,1% e acetonitrila	Eritromicina	734→158, 558, 576	ESI	QqQ	0,2 µg.kg ⁻¹	21	
						Oleandomicina	688→158, 544			0,1 µg.kg ⁻¹		
						Espiramicina	843→174, 540, 318			0,9 µg.kg ⁻¹		
						Tilmicosina	869→174, 156			0,3 µg.kg ⁻¹		
						Tilosina	916→174, 145, 772			0,1 µg.kg ⁻¹		
Ovos	Desproteínização com acetonitrila	Silica SPE Supelclean LC-SI	Triagem qualitativa: concentração alvo: 10 ppb	YMC phenyl 50 x 4mm, 3µm	Ácido fórmico 0,1% e acetonitrila	Eritromicina	734→576, 522, 558	ESI	QIT	1 ng.mL ⁻¹	29	
						Tilosina	916→772, 407, 598			1 ng.mL ⁻¹		
Mel	Dissolução em tampão Na ₂ CO ₃ – NaHCO ₃ (pH 9)	Bond Elut C18	Superposição da matriz	Zorbax C8 150 x 2,1 mm, 5 µm	Ácido trifluoroacético, metanol e acetonitrila	Tilosina	916,174	APCI	Q	0,01 µg.kg ⁻¹	27	
Músculo e pele de salmão	Extração com tampão formato 10 mM	HLB e partição com cloreto de metileno	Calibração externa	Prodigy ODS(3) 250 x 2 mm	Formato de amônio 3mM e acetonitrila	Eritromicina	734, 576, 558, 158	ESI	Q		15	

Validação de Métodos Analíticos

Os métodos analíticos para a determinação de contaminantes em alimentos em níveis residuais são a principal ferramenta para assegurar que eles estejam dentro dos LMR legalmente estabelecidos.⁹¹ A validação destes métodos certifica que os mesmos forneçam resultados confiáveis e garantam a disponibilidade de alimentos seguros. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, na inclusão de novas técnicas ou no uso de diferentes equipamentos.

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) preconiza que, no que diz respeito à análise de alimentos, os requerimentos para os métodos analíticos envolvem estudos de desempenho a partir de ensaios interlaboratoriais (ensaio de proficiência, estudo colaborativo ou triagem colaborativa), preenchendo os requisitos para comporem o que se classifica como procedimento de validação completa do método analítico (*full validation*). No entanto, quando se pretende garantir a viabilidade do método antes de se proceder à validação completa, ou para a publicação de artigos científicos, a validação completa de um método analítico não é necessária. Em tais circunstâncias considera-se apropriada a validação do método em um único laboratório (*single-laboratory validation* ou *in house validation*).⁹²

No Brasil, os procedimentos adotados baseiam-se em guias disponibilizados por órgãos como a ANVISA,⁹³ o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO)⁹⁴ e o MAPA.⁹⁵ A validação pode também ser baseada em guias internacionais como “International Organization for Standardization ” (ISO),⁹⁶ “International Conference

on Harmonization” (ICH),⁹⁷ ou ainda nas Diretivas da Comunidade Europeia,⁹⁸ e guias disponibilizados pelo “United States – Food and Drug Administration” (FDA).^{99, 100}

Os parâmetros de validação para métodos analíticos instrumentais baseados na separação cromatográfica por HPLC incluem a seletividade, linearidade e faixa de aplicação, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LOQ) e robustez. Alguns guias preconizam a avaliação do limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$), em substituição aos limites de detecção e quantificação. No caso da detecção ser realizada por MS torna-se necessário também avaliar o efeito matriz.^{94, 92, 101}

Na validação de métodos analíticos para a determinação de contaminantes tóxicos em alimentos, onde os LMR específicos de cada analito são estabelecidos, algumas considerações especiais são necessárias, já que os mesmos devem ser considerados no protocolo de validação, de maneira a assegurar que o método seja capaz de detectar os analitos em questão nestas concentrações.⁹¹

A seletividade é caracterizada pela capacidade de produzir respostas distintas entre vários analitos e entre os analitos e outras substâncias presentes na amostra, garantindo que o pico cromatográfico de seja exclusivamente dos compostos em estudo.^{94, 101}

A União Europeia criou um sistema de pontuação em espectrometria de massas para considerar a identificação inequívoca de contaminantes orgânicos em alimentos, conforme a tabela 2.⁹⁸

Tabela 2: Relação entre os fragmentos mássicos e os pontos de identificação obtidos.⁹⁸

Técnica de Espectrometria de Massas	Pontos de identificação obtidos por íon
Espectrometria de massas de baixa resolução (LR)	1,0
LR-MS ⁿ – íon precursor	1,0
LR-MS ⁿ – íon produto	1,5
Espectrometria de massas de alta resolução (HR)	2,0
HR-MS ⁿ – íon precursor	2,0
HR-MS ⁿ – íon produto	2,5

Obs.: Cada íon pode ser contabilizado uma única vez; substâncias diferentes podem ser consideradas para aumentar o número de pontos se derivarem de diferentes mecanismos de reação; são considerados como íon produto tanto os de segunda quanto os de terceira geração; a espectrometria de massas pode ser considerada de alta resolução se esta for tipicamente superior a 10000 para todo o intervalo mássico a 10 % do vale.

Desta forma, como os espectrômetros de massa do tipo triplo-quadrupolo podem fornecer informações sobre fragmentos dos analitos, eles cumprem os requisitos no que diz respeito à capacidade de quantificação e confirmação de identidade requeridos. Mais especificamente, no caso do uso deste tipo de espectrômetro, o monitoramento do íon precursor mais dois íons-produto atende aos requisitos da Comunidade Europeia no que diz respeito à identificação de substâncias não banidas, como é o caso dos macrolídeos. Ainda segundo estes critérios, pelos menos dois íons (um precursor e um produto) devem ser monitorados para atingir a pontuação de identificação mínima de três em espectrômetros de massa da alta resolução.

Cabe avaliar que estas definições da Comunidade Europeia não levam em consideração a exatidão de massa para a confirmação de um contaminante químico, desconsiderando instrumentos que tem exatidão de massa de até 5 ppm, que fornecem especificidade suficiente para a confirmação dos compostos alvo e permitem a atribuição de possíveis composições elementares, mas que não fornecem resolução superior a 10.000.²⁰ Assim, novos critérios foram propostos para a atribuição da pontuação de identificação que usassem o erro de massa absoluto ou relativo ao invés da resolução de massa, sendo que o segundo ainda traria a vantagem de que o critério de pontuação seria válido dentro de uma faixa de massas, independentemente dos valores de m/z .²² Segundo estes critérios, o monitoramento de dois íons, com erros de massa no intervalo de 2 a 10 ppm, seriam suficientes para atingir a mínima pontuação de identificação. Por exemplo, usando a dissociação por colisão induzida, instrumentos do tipo QToF poderiam adquirir espectros ricos em fragmentos e conseqüentemente mais pontos seriam atribuídos para a confirmação do composto.

O FDA dos EUA exige que a abundância relativa entre dois íons-fragmento monitorados coincida com a do padrão de referência da substância em $\pm 10\%$ de tolerância, quando são monitorados três íons fragmentos essa tolerância sobe para $\pm 20\%$.¹⁰⁰ É importante ressaltar que as abundâncias relativas entre os íons de macrolídeos obtidos em espectrometria de massas permanecem consistentes dentro de um mesmo dia, mas podem variar de um dia para outro.²⁴ Desta forma, as intensidades relativas dos íons de macrolídeos devem ser comparadas com seus padrões analíticos sob as mesmas condições analíticas, ou seja, na mesma batelada de análises^{30, 37} A consistência nos tempos de

retenção na cromatografia líquida e também das abundâncias relativas entre os íons é essencial para a confirmação da presença dos macrolídeos nas amostras.

A linearidade refere-se à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma faixa de aplicação, e é normalmente expressa pelo o coeficiente de correlação linear (r), obtido a partir da curva analítica pelo método estatístico de regressão linear.

A construção da curva analítica para a análise de macrolídeos por LC-MS tem se dado através de padronização externa, onde se compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas de soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de padrões analíticos;^{15, 53} de padronização interna, que consiste na preparação de soluções padrão com concentrações conhecidas da substância de interesse, adicionadas de uma quantidade conhecida e constante de um padrão interno;^{17, 22, 30, 37, 39} ou de superposição de matriz (*matrix-matched*) que se dá pela adição dos padrões da substância em diversas concentrações em uma matriz similar ou idêntica à da amostra, isenta dos macrolídeos em questão.^{17, 22, 30, 23, 37, 39} A superposição da matriz é recomendada quando a matriz interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse, independentemente do uso de padronização interna. Esse método pode ser tedioso, principalmente quando o preparo da amostra é complexo e demorado, mas sua principal vantagem sobre o método de padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra.^{95, 101}

A maioria dos estudos reportados para a quantificação de macrolídeos em alimentos considera precisão em dois níveis distintos: a repetibilidade, que avalia a concordância

entre os resultados do método, sob as mesmas condições de medição; e a precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial) que representa a variação nos resultados do método no mesmo laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. Tanto a repetibilidade como a precisão intermediária são expressas por meio da estimativa do desvio padrão relativo (RSD – *relative standard deviation*), com repetições de acordo com as recomendações das agências credenciadoras tomadas como referência.^{94, 95, 101} A exatidão normalmente é estimada através de ensaios de recuperação, através da aplicação do método em amostras adicionadas com quantidades conhecidas dos padrões analíticos dos macrolídeos (*spike*) em pelo menos três diferentes concentrações. Ainda que esta técnica seja limitada pelo fato de que os analitos adicionados não se apresentem necessariamente na mesma forma que na amostra naturalmente contaminada, e eventualmente ocasionando avaliações excessivamente otimistas, esta é a técnica mais comumente aplicada, já que é praticamente impossível encontrar materiais de referência certificados (CRM – *certified reference material*) para matrizes alimentícias com concentrações em níveis residuais de medicamentos de uso veterinário e que são poucos os métodos de referência disponíveis para análises quantitativas de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.⁹⁴

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são normalmente estimados através da relação sinal-ruído (S/N - *signal to noise ratio*), onde é feita a comparação entre os sinais de amostras em concentrações conhecidas na matriz e o ruído de fundo (*background noise*) da matriz isenta do composto de interesse, estabelecendo-se o LD e o LQ como as concentrações mínimas nas quais relação S/N é de 3:1 e de 10:1, respectivamente.^{22, 37, 38} Alguns autores preconizam que o método baseado em parâmetros

da curva analítica é estatisticamente mais confiável, onde os LD e LQ são expressos como: $LD = 3,3x(s/S)$ e $LQ = 10x(s/S)$, onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta e S é a inclinação (*slope*) do gráfico de calibração.^{94, 101} Alguns trabalhos não reportam os LD e LQ, mas sim o limite de decisão ($CC\alpha$ - limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α) e a capacidade de detecção ($CC\beta$ - teor mais baixo que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β), conforme recomendado pelo MAPA e a Comunidade Europeia^{39, 23, 26, 14, 95, 92}. Deve-se considerar que o $CC\alpha$ e $CC\beta$ são úteis para determinar se uma amostra está ou não conforme com relação aos LMR legalmente estabelecidos, mas não servem como parâmetros para a avaliação de desempenho de métodos analíticos ou para comparação entre métodos ou técnicas analíticas diferentes aplicadas para um mesmo fim.

Presença de macrolídeos em alimentos e aspectos de regulamentação

A presença de macrolídeos na cadeia alimentícia como consequência de seu uso na medicina veterinária tem preocupado o meio acadêmico e as autoridades reguladoras e fiscalizadoras devido a seu impacto em questões de saúde pública e de comércio internacional. A Organização Mundial da Saúde (OMS) trata dos problemas relacionados à presença de contaminantes em alimentos em relatórios emitidos pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (OMS).¹⁰²

Para garantir a segurança na cadeia de suprimento de alimentos aos consumidores e viabilizar o comércio internacional de alimentos, órgãos internacionais (Codex Alimentarius),¹⁰³ regionais (União Europeia e Mercosul),^{13, 104} assim como agências de

regulamentação nacionais (*Food and Drug Administration* dos EUA (FDA), MAPA e Ministério da Saúde do Brasil, Ministério do Trabalho e do Bem-Estar do Japão)^{105, 106, 107, 108} estabeleceram limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos nos alimentos, incluindo os macrolídeos, com bases em dados toxicológicos, como os valores aceitáveis de ingestão diária, e na capacidade de detecção e quantificação dos métodos analíticos disponíveis. A Tabela 3 indica os LMR estabelecidos pela Comunidade Europeia,¹³ pelo Codex Alimentarius,¹⁰³ pelo Ministério da Agricultura do Brasil,¹⁰⁵ pelo Ministério da Saúde, do Trabalho e do Bem Estar do Japão¹⁰⁷, e pelo FDA dos EUA¹⁰⁸ para alguns macrolídeos.

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o órgão que coordena e controla as atividades de inspeção, registro e controle de risco, bem como estabelece normas e padrões relativos à segurança alimentar. Em 2003 a ANVISA oficializou o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet, o qual estabelecia, o monitoramento de eritromicina em leite, dentre outros fármacos. Até o terceiro ano (2005) de atividades do PAMVET, apenas o monitoramento de amostras de leite havia sido realizado.¹⁰⁶

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), compartilha as atividades de vigilância sanitária com a ANVISA e em 1995 instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), o qual prevê a adoção de programas setoriais de controle de remanescentes residuais em carne, leite, mel e pescado, em decorrência do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários, ou por acidentes envolvendo contaminantes ambientais.¹¹⁰

Tabela 3. Limites máximos de resíduos (em $\mu\text{g.kg}^{-1}$) de alguns macrolídeos em várias matrizes alimentícias

Macrolídeo	Resíduo Marcador	Espécie	Matriz	LMR (UE) ¹³	LMR (Codex Alimentarius) ¹⁰³	Limite de referência (MAPA) ¹⁰⁵	LMR (Merco-sul) ¹⁰⁴	LMR (FDA) ¹⁰⁸	LMR (Japão) ¹⁰⁷
Eritromicina	Eritromicina A	Todas as produtoras de alimentos		200					
		Gado, porcos, frangos	Músculo			200	400	100	50
		Frango			100			125	
		Abelha	Mel			10			
		Gado	Leite	40			40		40
		Galinha	Ovos	150	50		200	25	90
Espiramicina	Espiramicina e Neoespiramicina	Gado, frango	Músculo	200	200				
		Porcos		300	200				
Tilmicosina	Tilmicosina	Todas as produtoras de alimentos - exceto aves		50					
		Frango	Músculo	75		250			70
		Porcos			100	1000		100	100
		Gado			100	300		100	100
		Caprinos			100			100	100
Tilosina	Tilosina A	Todas as produtoras de alimentos		100					
		Suíno	Músculo		100	100		200	50
		Gado			100	100		200	50
		Aves				100			
		Frango			100			200	50
		Galinha	Ovos	200	300			200	200
		Gado	Leite	50	100			50	50
		Abelha	Mel			10			
Josamicina		Aves, suínos	Músculo	200					

O PNCRC de 2010, prevê a determinação de resíduos de representantes das classes dos macrolídeos em algumas matrizes como carne de suínos, equinos, bovinos e aves e mel.¹⁰⁵ No entanto, a fiscalização e a comunicação de risco com relação à presença de contaminantes em alimentos no Brasil têm ocorrido principalmente como consequência da não adequação às exigências do mercado externo, deixando em segundo plano a proteção da saúde da população propriamente dita.¹¹¹ Por isso, no caso dos limites máximos de resíduos não estarem estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, utiliza-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os constantes nas Diretivas da União Europeia e os utilizados pelo “Food and Drug Administration” (FDA) dos Estados Unidos.

É importante ressaltar que a josamicina não está incluída na lista de medicamentos veterinários permitidos para uso em animais para a produção de alimentos pelo MAPA, pelo FDA e pelo Codex Alimentarius.^{103, 105, 109}. O MAPA e o FDA também não incluem a espiramicina dentre os antimicrobianos permitidos na pecuária.^{105, 109} Dentre os LMR estabelecidos pelo Mercosul, o único antimicrobiano da classe dos macrolídeos citado é a eritromicina.¹⁰⁴ A União Europeia banuiu o uso de espiramicina e tilosina como aditivos à ração (como promotores de crescimento) devido à crescente preocupação com a transferência de resistência entre diferentes bactérias e entre animais e humanos.⁵⁹

Conclusões

Os macrolídeos são antibióticos comumente usados na medicina veterinária que estão sob a regulamentação das agências nacionais e internacionais de segurança alimentar e podem eventualmente ser encontrados nos alimentos.

Dentre as técnicas para tratamento de amostras alimentícias para análise de macrolídeos, a extração em fase sólida com cartuchos HLB tem se destacado, já que a complexidade deste tipo de matriz leva à necessidade de limpeza e concentração do extrato. Ainda assim, o uso de outras fases estacionárias e técnicas como a partição e a extração líquido-líquido têm sido reportadas. A seleção do método de extração depende da natureza da matriz e do tipo de estudo a ser realizado.

A espectrometria de massas vem significativamente substituindo as técnicas de detecção ótica (ultravioleta, arranjo de diodos e fluorimetria) e eletroquímica em métodos quantitativos multiresíduos para detecção de macrolídeos em matrizes alimentícias.

Os espectrômetros de massas do tipo QqQ no modo SRM têm se apresentado como os mais sensíveis e, conseqüentemente, os mais utilizados para a quantificação e confirmação de identidade dos macrolídeos. O uso deste tipo de espectrômetro em outros modos de varredura pode facilitar a identificação de macrolídeos, seus produtos de degradação ou biodegradação, e também de subprodutos intrínsecos a seus processos de produção.

Apesar de apresentarem repetibilidade fraca e faixas dinâmicas relativamente estreitas, os espectrômetros de massa do tipo QIT ainda podem ser atrativos para quantificar e identificar macrolídeos em matrizes alimentícias devido à sua sensibilidade relativamente alta no modo de varredura completa e principalmente à possibilidade de realizar experimentos do tipo MSⁿ. Os espectrômetros de massa do tipo QLIT reúnem as vantagens do QqQ e do QIT, sem comprometer o desempenho de nenhum deles. Ainda que seu uso na análise de macrolídeos tenha sido raramente reportado, pode-se especular que este tipo de espectrômetro

de massas venha ganhar importância nesta área, devido à sua capacidade de realizar análises nos modos SRM e de varredura do íon produto simultaneamente com boa detectabilidade.

A técnica de UHPLC surgiu mediante os recentes avanços na tecnologia de separação cromatográfica, permitindo o uso de colunas com partículas menores que 2 μm que, quando acopladas a um espectrômetro de massas híbrido do tipo QqQ ou QToF, reduzem significativamente o tempo de análise, mantendo a eficiência de separação e melhorando a sensibilidade, em comparação à técnica de LC-MS/MS.

A aplicação da técnica de UHPLC acoplada a espectrômetros de massas do tipo ToF ou QToF para selecionar, quantificar e identificar macrolídeos e seus produtos de degradação ou biodegradação em matrizes complexas vem sendo reconhecida devido às características de rápida separação cromatográfica, alto poder de resolução, capacidade de medição de massa exata e excelente sensibilidade no modo de varredura completa. Há de se reconhecer as limitações destes instrumentos com relação à repetibilidade e faixa dinâmica quando comparados ao QqQ, mas ainda assim eles têm demonstrado boa aplicabilidade na análise de macrolídeos em níveis traço nos alimentos.

A validação dos métodos analíticos para a quantificação de macrolídeos em matrizes alimentícias não somente garante a confiabilidade e a aplicabilidade dos mesmos para fins regulatórios, mas também permite a comparação entre as várias técnicas analíticas disponíveis e permite a proposição de novas metodologias e técnicas para este fim. As normas regulatórias e os guias para validação têm que estar em constante revisão, de maneira a se adequar às novas tecnologias disponíveis, melhorando o aproveitamento dos recursos que estes novos instrumentos oferecem.

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica poderosa e os vários tipos de espectrômetros de massas continuam a apresentar papéis complementares na determinação de macrolídeos e compostos relacionados. Os avanços nesta área da química analítica devem melhorar a capacidade de determinar macrolídeos, bem como de outros contaminantes em alimentos, à medida que instrumentos mais avançados, como os QLIT, se tornem mais acessíveis aos laboratórios das agências de fiscalização de segurança alimentar, trazendo benefícios ao comércio internacional de alimentos e à segurança do consumidor.

Referências Bibliográficas

1. Horie M. Em Chemical analysis for antibiotics used in agriculture; Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., MacNeil, J.D., eds.; AOAC International: Arlington, **1995**, cap. 6.
2. Gustafson, R. H.; Bowen, R. E.; Journal of Applied Microbiology **1997**, 83, 531.
3. Draisci, R.; Palleschi, L.; Ferretti, E.; Achene, L.; Cecilia, A.; J. Chromatogr., A **2001**, 926, 97.
4. Mellon, M.; Benbrook, C.; Benbrook, K.L. Em Hogging it: Estimates of antimicrobial abuse in livestock; UCS Publications: Cambridge, **2001**, p.1
5. Florea ,N. F.; Nightingale, C. H.; Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **2004**, 49,105.
6. Mathur, S.; Singh, R.; Int. J. Food Microbiol. **2005**, 105, 281.
7. Mellon, M.; Benbrook, C.; Benbrook, K.L. Em Hogging it: Estimates of antimicrobial abuse in livestock; UCS Publications: Cambridge, **2001**, p.60
8. http://www.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf, acessada em Dezembro, 2010.
9. Kanfer, I. ; Skinner, M. F. ; Walker, R. B. ; J. Chromatogr., A **1998**, 812, 255.
10. Gobel, A. ; McArdeall, C. S. ; Suter, M. J. , Giger, W. ; Anal. Chem. (Washington, DC, U.S.), **2004**, 76, 4756.

11. Chitneni, S. K. ; Govaerts, C. ; Adams, E. ; Van Schepdael, A. ; Hoogmartens, J. ; J. Chromatogr., A **2004**, 1056, 111.
12. Deubel, A. ; Fandino, A. S. ; Sorgel, F. ; Holzgrabe, U. ; J. Chromatogr., A **2006**, 1136, 39.
13. <http://www.emea.europa.eu/htms/vet/mrls/l.htm>, acessada em Novembro 2009.
14. Lucchetti, D. ; Fabrizi, L. ; Esposito, A. ; Guandalini, E. ; Di Pasquale, M. ; Coni, E. ; J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 9689.
15. Billedeau, S. M. ; Heinze, T. M. ; Siitonen, P. H. ; J. Agric. Food Chem. **2003**, 51, 1534.
16. Wilson, R. C. Em Macrolide antibiotics: Chemistry, biology, and practice ; Omura, S., ed; Academic Press Inc: New York **1984**, cap. 8.
17. Nalda, M. J. N. , Yague, J. L. B. ; Gomez, M. T. M. ; Sevilla, J. J. J. ; del Nozal, J. B. ; Pascual, M. H. ; J. Sep. Sci. **2006**, 29, 405.
18. Kochansky, J. ; J. Apicul. Res. **2004**, 43, 65.
19. Careri, M. ; Bianchi, F. ; Corradini, C. ; J. Chromatogr. A **2002**, 970, 3.
20. Wang, J. ; Mass Spectrom. Rev. **2009**, 28, 50.
21. Wang, J. ; Leung, D. ; Butterworth, F. ; J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 1857.
22. Wang, J. ; Leung, D. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2007**, 21, 3213.
23. Hammel, Y. A. ; Mohamed, R. ; Gremaud, E. ; Lebreton, M. H. ; Guy, P. A. ; J. Chromatogr., A **2008**, 1177, 58.
24. Wang, J. ; J. Agric. Food Chem. **2004**, 52, 171.
25. Caldow, M. ; Stead, S. L. ; Day, J. ; Sharman, M. ; Situ, C. ; Elliott, C. ; J. Agric. Food Chem. **2005**, 53, 7367.
26. Benetti, C. ; Piro, R. ; Binato, G. ; Angeletti, R. ; Biancotto, G. ; Food Addit. Contam., Part A **2006**, 23, 1099.
27. Thompson, T. S. ; Noot, D. K. ; Calvert, J. ; Pernal, S. F. ; J. Chromatogr., A **2003**, 1020, 241.
28. Cherlet, M. ; De Baere, S. ; Croubels, S. ; De Backer, P. ; Anal. Chim. Acta **2002**, 473, 167.

29. Heller, D. N. ; Nochetto, C. B. ; J. Agric. Food Chem. **2004**, 52, 6848.
30. Wang, J. ; Leung D. ; Lenz, S. P. ; J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 2873.
31. Tang, H. P. ; Ho, C. ; Lai, S. S. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2006**, 20, 2565.
32. Granelli, K. , Branzell, C. ; Anal. Chim. Acta **2007**, 586, 289.
33. Van Poucke, C. ; De Keyser, K. ; Baltusnikiene, A. ; McEvoy, J. D. G. ; Van Peteghem, C. ; Anal. Chim. Acta **2003**, 483, 99.
34. Van Poucke, C. ; Dumoulin, F. ; De Keyser, K. ; Elliott, C. ; Van Peteghem, C. ; J. Agric. Food Chem. **2004**, 52, 2803.
35. Bryskier, A ; J Antimicrob. Chemother. **1998**, 41(Suppl B), 1.
36. Chen, L. ; Qin, F. ; Ma, Y. ; Li, F. ; J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., **2007**, 855, 255.
37. Bogialli, S. ; Di Corcia, A. ; Lagana, A. ; Mastrantoni, V. ; Sergi M. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2007**, 21, 237.
38. Thompson, T. S. ; Noot, D. K. ; Calvert, J. ; Pernal, S. F. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2005**, 19, 309.
39. Thompson, T. S. ; Pernal, S. F. ; Noot, D. K. ; Melathopoulos, A. P. ; van den Heever, J. P. ; Anal. Chim. Acta **2007**, 586, 304.
40. Maldaner, L. ; Jardim, I. C. S. F. ; Quim. Nova **2009**, 32, 214.
41. Swartz, M. E. ; LCGC North Am. Special Issue May, **2005**, 9
42. Churchwell, M. I. ; Twaddle, N. C. ; Meeker, L. R. ; Doerge, D. R. ; J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. **2005**, 825, 134.
43. Guillarme, D. ; Nguyen, D. T. ; Rudaz, S. ; Veuthey, J. L. ; J. Chromatogr., A, **2007**, 1149, 20.
44. Codony, R. ; Compano, R. ; Granados, M. ; Garcia-Regueiro, J. A. ; Prat, M. D. ; J. Chromatogr., A **2002**., 59, 131.
45. Gonzalez de la Huebra, M. J. ; Vincent, U. ; J. Pharm. Biomed. Anal. **2005**, 39, 376.
46. Horie, M.; Saito K.; Ishii, R.; Yoshida, T.; Haramaki, Y.; Nakazawa, H.; J. Chromatogr., A **1998**, 812, 295.

47. Leroy, P. ; Decolin, D. ; Nicolas, A. ; Archimbault, P. ; Analyst (Cambridge, U. K.) **1994**, 119, 2743.
48. Sastre Torano, J. ; Guchelaar, HJ. ; J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. **1998**, 720, 89.
49. Edder, P. ; Coppex, L. ; Cominoli, A. ; Corvi, C. ; Food Addit. Contam., Part A **2002**, 19, 232.
50. Gonzalez de la Huebra, M. J.; Bordin, G. ; Rodriguez, A. R. ; Anal. Bioanal. Chem. **2003**, 375, 1031.
51. Barrett, B. ; Borek-Dohalsky, V. ; Fejt, P. ; Vaingatova, S. ; Huclova, J. ; Nemec, B. ; Jelinek, I. ; Anal. Bioanal. Chem. **2005**, 383, 210.
52. Chen, B. M. ; Liang, Y. Z. ; Chen, X. ; Liu, S. G. ; Deng, F. L. ; Zhou P. ;J. Pharm. Biomed. Anal. **2006**, 42, 480.
53. Hamscher, G. ; Limsuwan, S. ; Tansakul, N. ; Kietzmann, M. ; J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 9017.
54. Scheuch, E.; Giessmann, T. ; Siegmund, W. ; J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. **2006**, 844, 84.
55. Scheuch, E. ; Spieker, J. ; Venner, M. ; Siegmund, W. ; J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. **2007**, 850, 464.
56. Leonard, S. ; Ferraro, M. ; Adams, E. ; Hoogmartens, J. ; Van Schepdael, A. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2006**, 20, 3101.
57. Dubois, M. ; Fluchard, D. ; Sior E. ; Delahaut, P. ; J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. **2001**, 753, 189.
58. Draisci, R. ; delli Quadri, F. ; Achene, L. ;Volpe, G. ; Palleschi, L. ; Palleschi, G. ; Analyst (Cambridge, U. K.) **2001**, 126, 1942.
59. European Commission ; Off J Eur Communities **1998**, L351, 4.
60. Van Poucke, C. ; Dumoulin, F. ; Van Peteghem, C. ; Anal. Chim. Acta **2005**, 529, 211.
61. Ye, Z. ; Weinberg, H. S. ; Meyer, M. T. ; Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.) **2007**, 79, 1135.
62. Gomez, M. J. ; Malato, O. ; Ferrer, I. ; Aguera, A. ; Fernandez-Alba, A. R. ; J. Environ. Monit. **2007**, 9, 718.

63. Kim, S. C. ; Carlson, K. ; Environ. Sci. Technol. **2007**, 41, 50.
64. Kim, S. C. ; Carlson, K. ; Anal. Bioanal. Chem. **2007**, 387, 1301.
65. Keller, B. O. ; Li, L. ; J. Am. Soc. Mass Spectrom., **2001**, 12 (9), 1055.
66. Waters Corporation, Micromass. Em: Q-ToF micro Mass Spectrometer Operator's Guide, Milford, **2002**.
67. Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Anal. Bioanal. Chem. **2005**, 382, 934.
68. Schlusener, M. P. ; Bester, K. ; Spiteller, M. ; Anal. Bioanal. Chem. **2003**, 375, 942.
69. Schlusener, M. P. ; Spiteller, M. ; Bester, K.; J. Chromatogr., A **2003**, 1003, 21.
70. Schlusener, M. P. ; Bester, K.; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2005**, 19, 3269
71. Rogatsky, E.; Stein, S.; J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005**, 16, 1757.
72. Horie, M.; Takegami, H.; Toya, K.; Nakazawa, H.; Anal. Chim. Acta **2003**, 492, 187.
73. Sparkman, O. D. Em: Mass spectrometry desk reference ; Global View Publishing: Pittsburgh, **2006**, 98
74. <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=63&numero=9> , acessada em Setembro 2010
75. Pico, Y. ; Blasco, C. ; Font, G. ; Mass Spectrom. Rev. **2004**, 23, 45.
76. Sparkman, O. D. ; *Mass spectrometry desk reference*, Global View Publishing: Pittsburgh, **2006**, p. 99.
77. Hager, J. W. ; Yves Le Blanc, J. C. ; J. Chromatogr., A **2003**, 1020, 3.
78. Soler, C. ; Hamilton, B. ; Furey, A. ; James, K. J. ; Manes, J. ; Pico, Y. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2006**, 20, 2151.
79. Govaerts, C. ; Chepkwony, H. K. ; Schepdael, A. V. ; Roets, E. ; Hoogmartens, J. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2000**, 14, 878.
80. Hager, J. W. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2002**, 16, 512.
81. Hager, J. W. ; Yves Le Blanc, J. C. ; Rapid Commun. Mass Spectrom. **2003**, 17, 1056.
82. Guilhaus, M. ; Selby, D. ; Mlynski, V. ; Mass Spectrom. Rev. **2000**, 19, 65.

83. Chernushevich, I. V. ; Loboda, A. V. ; Thomson, B. A. ; J. Mass Spectrom. **2001**, 36, 849.
84. Stolker, A. A. ; Niesing, W. ; Fuchs, R. ; Vreeken, R. J. ; Niessen, W. M. ; Brinkman, U. A. ; Anal. Bioanal. Chem. **2004**, 378, 1754.
85. Stolker, A. A. ; Niesing, W. ; Hogendoorn, E. A. ; Versteegh, J. F. ; Fuchs, R. ; Brinkman U. A. ; Anal. Bioanal. Chem. **2004**, 378, 955.
86. Bueno, M. J. ; Aguera, A. ; Gomez, M. J. ; Hernando, M. D. ; Garcia-Reyes, J. F. ; Fernandez-Alba, A.R. ; Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.) **2007**, 79, 9372.
87. Garcia-Reyes, J. F. ; Hernando, M. D. ; Ferrer, C. ; Molina-Diaz, A. ; Fernandez-Alba, A. R. ; Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.) **2007**, 79, 7308.
88. Petrovic, M. ; Gros, M. ; Barcelo, D. ; J. Chromatogr., A **2006**, 1124, 68.
89. Petrovic, M. ; Barcelo, D. ; J. Mass Spectrom. **2006**, 41, 1259.
90. Barcelo, D. ; Petrovic, M. ; Trends Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.) **2007**, 26, 2.
91. Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F. P. S.; Reyes, F. G. R.; Quím. Nova **2008**, 31, 1190
92. Thompson, M.; Stephen, L. R.; Wood, R. ; Pure Appl. Chem **2002**, 74, 835.
93. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. RE nº 899, de 29/05/2003. Diário Oficial da União de 02/05/2003.
94. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
95. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União de 22/07/2009, Seção 1, Página 7
96. International Standard Organization. ISO/EC 17025, **1999**.
97. International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4, Consensus Guideline. November, **1996**
98. European Commission; Off. J. Eur. Communities **2002**, L221, 8.
99. United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May, **2001**.

100. United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services. *Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues. FINAL GUIDANCE*. May, **2003**.
101. Ribani, M; Bottoli, C. B. G; Collins, C. H; Jardim, I. C. S. F; Melo, L. F. C. ; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
102. Anadón, A.; Martinez-larranaga, M. R.; *Livestock Production Science* **1999**, 59, 183.
103. <http://www.mrlatabase.com/>, acessada em Janeiro, 2010
104. Mercosul. MERCOSUL/GMC/RES N° 54/00. Setembro, **2000**
105. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União de 03/05/2010, Seção 1, Página 27.
106. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 253 de 16/09/2003. Diário Oficial da União de 18/09/2003.
107. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>, acessada em Novembro 2010.
108. <http://www.mrlatabase.com/>, acessada em Janeiro, 2010
109. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts>, acessada em Novembro 2010.
110. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ; Diário Oficial da União de 16/08/1995, Seção 2, Página 6048.
111. Spisso, B. F.; Nóbrega, A. W.; Marques, M. A. S.; *Ciência & Saúde Coletiva* **2009**, 14, 2091

Capítulo II.

A simple LC-QToF method for macrolides determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets.

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Journal of Agriculture and Food Science*

**A simple LC-QToF method for macrolides determination in tilapia
(*Oreochromis niloticus*) fillets.**

Abstract

A method for the identification and quantification of five macrolides (erythromycin, josamycin, tilmicosin, tylosin, spiramycin) in tilapia fillets by LC-QToF is presented. Sample preparation was carried out by ethanol extraction and deproteinization, hexane deffating of the extract, followed by analytes concentration by solvent evaporation. Matrix matched calibration was applied because the method presented significant matrix effect for all analytes except tylosin. Limits of quantification were lower than 45% of the macrolides maximum residue limits (MRL) adopted by regulatory agencies. Differences between (CC α) and MRL were lower than 10%. Method validation proved that it is in accordance with the European Community recommendations (EC, 2002) for the analysis of contaminants in food. Twenty samples from the retail market of São Paulo State, Brazil were submitted to the developed method, none of them presented positive results for the macrolides studied.

Keywords: high performance liquid chromatography, mass spectrometry, aquaculture, tilapia, macrolides

Introduction

World fish capture has reached its apex in the 1990s. In contrast, aquaculture has presented growth rates close to those of global population (FAO, 2009). Tilapia is the most widely grown specie of any farmed fish. In 2004, tilapia was the eighth most popular seafood in the USA and its production is projected to increase from 1.5 million tones in 2003 to 2.5 million tones by 2010, with a sales value of more than USD 5 billion. Most of this production is attributed to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2010).

In this context, tilapia farming presents a very competitive scenario where producers keep the largest fish density possible within a single tank. The use of antimicrobials in the production system for therapeutic (disease control), prophylactic (disease prevention), and sub-therapeutic (growth promotion) purposes is almost inevitable, since the spread of an eventual bacterial disease in the production tanks certainly would jeopardize production.

In food production of animal origin, an incorrect use of antimicrobials, or the disrespect of withdrawal time after treatment, can lead to the presence of antibiotic residues in foods. These residues can cause the problem of drug-resistant pathogenic bacterial strains and provoke allergic reactions to some hypersensitive individuals as well (Wang, 2009).

Macrolides are highly potent antimicrobials used in veterinary practices against a wide variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Chemically, they consist of macrocyclic lactone rings with 14 (erythromycin, roxithromycin, clarithromycin), 15 (azithromycin) or 16 (spiramycin, tylosin, tilmicosin, josamycin) carbons linked to carbohydrate molecules with basic and lipophilic characteristics (Kanfer *et al.*, 1998). In

general, macrolide antibiotics present pK_as between 7.1 and 9.9 (Gobel *et al.*, 2004). Those are important characteristics when someone considers the development of methods for the extraction of these substances from food matrices and their chromatographic separation. Some macrolide antibiotics are sensitive to low pHs and suffer degradation under acidic conditions (Horie, 1995). The World Organization for Animal Health (OIE, 2007) considers three macrolides (josamycin, erythromycin and spiramycin) as “critically important” antimicrobials for fish harvesting, as they are essential against specific infections that affect some species and there is a lack of therapeutic alternatives.

Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2010), as well as regional (European Community (European Medicines Agency, 2010), MERCOSUR (MERCOSUR, 2000)), and national regulatory agencies (United States Department of Agriculture (USDA, 2010), Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA, 2010), and the Japan Minister of Health, Labour and Welfare (The Japan Food Chemical Research Foundation, 2010)) have established maximum residue limits (MRL) for macrolides in food matrices, and some of them include MRL for fish matrices. Nonetheless, it is important to note that neither the MERCOSUR (MERCOSUR, 2000), nor the US FDA (FDA, 2010) or Brazilian (MAPA, 2010) regulatory agencies have approved any macrolide drug for use in aquaculture.

The presence of macrolide residues in food as a result of their abusive use in veterinary practices has a significant impact on public health and on food international trade and has raised concerns to the scientific community and the regulatory agencies (Wang, 2009). Analytical methods for the identification and quantification of these antimicrobials are fundamental to establish effective dose recommendation and withdrawal periods through pharmacokinetic studies; and to evaluate the impact of the employment of

these substances in aquaculture on the economic and food safety contexts. On the other hand, few scientific papers about analytical methods for the quantification of macrolides in tilapia meat have been reported, and none of them have reported the use of Liquid Chromatography coupled to Quadrupole-Time of Flight spectrometer (LC-QToF). Mass spectrometry (MS) is a universal detection technique, which is ideal for multi-residue analysis, and QToF mass spectrometers offer the possibility to get full scan spectra with medium to high resolution, good sensitivity and exact mass measurement.

This article presents a simple method for the identification and quantification of five macrolides (erythromycin, josamycin, tilmicosin, tylosin, spiramycin) in Nile tilapia fillets by high performance liquid chromatography coupled to quadrupole – time of flight (HPLC-QToF) mass spectrometry. After validation, the method was applied to analyze samples from the retail market of São Paulo State, Brazil. Figure 1 presents the structural formula of the studied macrolides.

Materials and Methods

Samples

Blank samples of refrigerated Nile tilapia fillets were supplied by the School of Agronomical and Veterinary Sciences, Julio de Mesquita State University, UNESP (Jaboticabal, SP, Brazil), which guaranteed the absence of macrolides residues. These samples were separated into portions of approximately 500 g and stored at -25 ± 2 °C before being analyzed.

Twenty samples were acquired from the retail market of São Paulo State (Brazil) and stored at -25 ± 2 °C before analysis. Twelve of them were entire fishes obtained from “fish and pay ponds” establishments and were filleted before freezing, four were from big

chain supermarkets, and four from street fairs. All the samples were analyzed within a maximum period of 10 days of storage. Table 1 describes the origin of each analyzed sample.

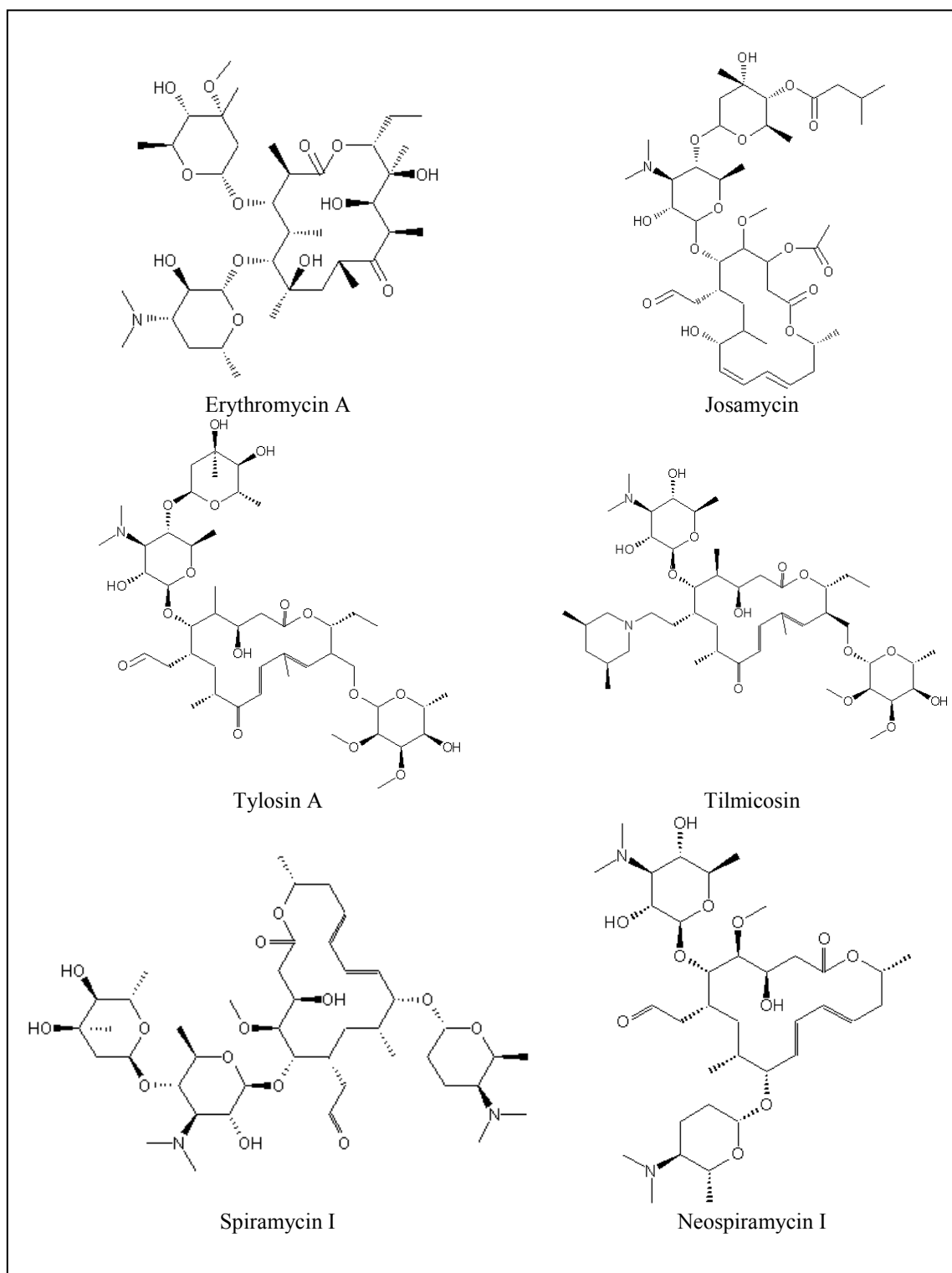


Figure 1. Molecular structure of the studied macrolides.

Table 1. Origin of the samples submitted to the developed method.

Sample	Retail Conditions		Type of Establishment	Location
1	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Espírito Santo do Pinhal
2	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Espírito Santo do Pinhal
3	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Batatais
4	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Batatais
5	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Batatais
6	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Batatais
7	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Batatais
8	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Batatais
9	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Ribeirão Preto
10	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Ribeirão Preto
11	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Ribeirão Preto
12	Entire fish	Fished at lake temperature	Fish and Pay	Ribeirão Preto
13	Entire fish	Refrigerated	Street Fair	Campinas
14	Entire fish	Refrigerated	Street Fair	Campinas
15	Entire fish	Refrigerated	Street Fair	Jaguariúna
16	Entire fish	Refrigerated	Street Fair	São Paulo city
17	Fillet	Refrigerated	Supermarket	Campinas
18	Fillet	Frozen	Supermarket	Campinas
19	Fillet	Frozen	Supermarket	Campinas
20	Fillet	Frozen	Supermarket	Campinas

Solvents and Reagents

Ethanol reagent grade (Synth, Brazil) and n-hexane HPLC grade (Omnisolv, USA) were used in extraction and clean up processes. HPLC grade methanol (MeOH) (Burdick & Jackson, USA), glacial acetic acid (HAc) (Merck, Brazil), and deionized water (H₂O) (purified by Gehaka OS20 LX System, Brazil) were used to compose the mobile phase for liquid chromatography.

Polyvinylidene difluoride (PVDF) hydrophilic and polytetrafluorethylene (PTFE) membranes (Millipore – USA) with 0.22 µm pore size were used to filter the aqueous and organic mobile phase solutions, respectively. PVDF Hydrophilic syringe filters (Millipore – USA), 33 mm diameter, 0.22 µm pore size, were used to filter the sample extracts before injection.

Standard Solutions

Table 2 lists the origin of macrolides analytical standards and the concentration of stock and working solutions. All standard solutions were prepared in HPLC grade methanol. Stock solutions were stored in tightly closed amber vessels at -25 °C for a maximum period of three months. Working solutions were daily prepared by dissolution of stock solution and used immediately after preparation. The working solution for all macrolides was prepared as a mixture of them, except for roxithromycin, which was used as internal standard and prepared as separate working solution.

A BL 2105 analytical balance (Sartorius, Germany) was used to weigh the reagents and standards. An Ultrasonic Cleaner (Cole Parmer – USA), a Himac CR21 centrifuge (Hitachi, Japan), an AP56 Vortex Agitator (Phoenix, Brazil) and a Centrivap Centrifuge Concentrator (Labconco, USA) were employed in sample preparation.

Table 2: Origin of analytical standards and concentration of standard solutions

Macrolide	Purity (%)	Origin	Stock solution ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Working solution ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Erythromycin (Erythromycin A)	96.7%	USP (USA)	100	1.20
Roxithromycin	97.6%	Sigma – Aldrich (Switzerland)	1000	4.00
Neospiramycin (Neospiramycin I)	97.7%	Waco (Japan)	1000	4.00
Spiramycin	88.9%	Fluka (Germany)	1000	4.00
Tilmicosin	86.5%	Fluka (Germany)	100	1.00
Josamycin	100.0%	Fluka-Biochemika (Japan)	100	1.00
Tylosin (Tylosin tartrate)	98.0%	Dr Ehrenstofer (Germany)	100	2.00

Equipment

A Waters Alliance 2695® HPLC chromatographic system (Waters, USA), composed of quaternary pumping and automatic injection systems was employed for the chromatographic separation. The HPLC system was interfaced with electrospray (ESI) ionization source, followed by the hybrid Q-ToF Micro® (Micromass, UK) mass spectrometer, composed of a quadrupole (Q) and a time of flight (ToF) analyzers with a hexapole collision cell between them. The data were acquired using the Masslynx® software (Micromass, UK).

Sample Preparation

Four grams of ground tilapia fillet were placed in a thirty milliliters centrifuge tube and submitted to ultra-sound bath for 5 minutes before the addition of five milliliters of ethanol reagent grade. The mixture was homogenized in a vortex mixer for 1 min and then centrifuged at 3500 g for 15 minutes. The supernatant was transferred to new 30 mL centrifuge tubes and other 5 milliliters of ethanol was added to the residue, which were homogenized and centrifuged in the same conditions. The combined supernatants resulted in a turbid extract of, approximately, 13 milliliters. The extract was centrifuged at 1300 g for 5 min in order to precipitate debris and an aliquot of 5 milliliters of its superior part was transferred to 30 milliliters glass round bottom centrifuge tubes. Clean up was performed by addition of 3 milliliters of HPLC n-hexane followed by vortex agitation for 30 s. The upper phase (n-hexane) was discarded by a vacuum tube after phase separation. The defatted extract was then dried in a centrifuge concentrator at 60 °C; suspended in H₂O:MeOH (8:2, v/v); filtered with 0.22 µm pore size syringe filters and injected into the HPLC system.

LC-QToF Conditions

Chromatographic separation was performed with a C18 XTerra® MS (150 x 2.1 mm, 5 µm – Waters, USA) reversed phase column at 25 °C. Aqueous HAc 1% (v/v) (solvent A) and 1% HAc in methanol (solvent B) constituted the mobile phase. The following gradient profile at constant flow rate of 0.3 mL.min⁻¹ was applied for chromatographic separation: 0 – 2.7 min: isocratic 20% B; 2.7 – 4.0 min: convex gradient to 80% B; 4.0 – 10.5 min: isocratic 80% B; 10.5 – 16 min: concave gradient to 20% B.

An optimized ESI signal was achieved at probe voltage of 3 kV; sample cone at 50 V for all analytes except erythromycin and neospiramycin, which best sample cone voltage

was 20 V; extraction cone at 2 V; source and desolvation temperatures of 130 °C and 380 °C, respectively; ion and collision energies of respectively 0 V and 15 V and cone and desolvation gas flows of respectively 50 and 440 L.h⁻¹. Data acquisition was performed in two channels at MS full scan mode with m/z range of 826-945 Da with cone voltage of 50 V for spiramycin, tylosin, tilmicosin and josamycin detection; and 697-864 Da with cone voltage at 20 V for erythromycin, neospiramycin and roxithromycin (internal standard) detection.

Confirmation was achieved under the same tuning conditions except the collision energy, which was increased in order to get the best tuning for the simultaneous detection of the precursor and at least two fragment ions for each macrolide, thus obtaining four identification points (IPs) for each analyte, according to EC (2002) criteria for residue identity confirmation. Exact mass was also measured for the macrolides precursor ions.

Method Validation

Method validation was performed according to the main international regulatory agencies, such as the European Community (EC, 2002) and the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Thompson, 2002), as well as the Brazilian recommendations (MAPA, 2010). The selectivity, analytical curve, linearity, sensitivity, precision (intra and inter-day repeatability), accuracy, matrix effect, and the detection and quantification limits were evaluated using spiked samples at 0.0; 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 times the maximum residue limits (MRL) established for each macrolide (table 3), as recommended by European Commission (EC, 2002) and (MAPA, 2009). These MRL were considered after an extensive literature research of the limits adopted by regulatory and inspections agencies, the lower limits found were then adopted as a reference for method development and validation.

Table 3. Maximum residue limits (MRL) adopted for method validation

Macrolide	Marker residue	Species	MRL ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Erythromycin	Erythromycin A	Perciforms	60 ^{*1}
Spiramycin	Sum of Spiramycin and Neospiramycin	Perciforms	200 ^{*1}
Tilmicosin	Tilmicosin	All food producing species - except poultry	50 ^{*2}
Tylosin	Tylosin A	All food producing species	100 ^{*2}
Josamycin	Josamycin	Perciforms	50 ^{*1}

^{*1} Japan Minister of Health, Labour and Welfare, 2010

^{*2} European Community, 2010

Minimum square method was applied to obtain linear regression parameters for the calibration curves and to determine the linearity and sensitivity. Data was gathered using the software Quanlynx ® (Micromass, UK), and statistical results were obtained using Microsoft Excel Software (Microsoft, USA).

Method selectivity was evaluated by verifying the absence of interfering peaks that could possibly compromise the identification and integration of the analytes or the internal standard peaks in ten blank samples.

The precision was determined in two conditions: (i) intra-day precision: through the relative standard deviation (RSD) in the results of three replicates in three concentrations (corresponding to 0.5; 1.0 and 1.5 times the MRL), analyzed on the same day by the same analyst and using the same instrument; and (ii) inter-day precision: through the RSD in the results of three replicates in the same concentrations, analyzed by the same analyst and using the same instrument performed on three different days.

The decision limits ($CC\alpha$) and detection capacities ($CC\beta$) of each macrolide were obtained from their respective inter-day precision, as described by EC (2002).

Blank tilapia samples were submitted to the established sample preparation procedure to evaluate accuracy and matrix effect. The resulting extracts were spiked with analytical standard solutions before resuspension, in the same concentration levels used in the precision tests. Since no certified reference material (CRM) was available, accuracy was evaluated by comparison of the results from blank samples that were spiked before extraction with the ones that were spiked after extraction (spiked extracts), and expressed as the percentage of the areas of the spiked extracts (EC, 2002, MAPA, 2009). Matrix effect was obtained by comparison of analytical standards solutions in MeOH: H₂O (2:8 v/v) areas with those of spiked extracts, by F and t statistical tests ($\alpha = 5\%$), and expressed as the percentage difference from the analytical standards solutions areas.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were estimated from the analytical curve, as recommended by Ribani, 2004. Each analyte LOQ, accuracy and precision was confirmed by the analysis of ten blank samples spiked at the estimated LOQ concentrations before extraction.

Results and Discussion

Sample preparation was carried out by alcoholic precipitation of tilapia meat proteins, in which the analytes were extracted with adequate efficiency (between 77% for neospiramycin at 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and 109% for erythromycin at 75 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Deproteinization with acetonitrile was first tested, but the extract formed a stable interface emulsion with n-hexane, interfering in the clean up step, and seriously affecting precision. Dispersive solid phase extraction (DSPE) and matrix solid-phase dispersion (MSPD) with florisol, neutral

aluminum oxide, octadecilsilane (C18) and primary-secondary amine (PSA) as absorbents were also tried, but recoveries were very poor when compared to the analytes diluted in water: methanol (8:2 v/v) at the same concentrations.

Table 4 presents method validation results. The ESI ionization spectra of macrolides presented a sharp change in the presence of tilapia meat matrix. Except for tylosin, which had no significant matrix effect, all of them presented the sodium adduct as the most intense ion in the absence of matrix. Oppositely, the protonated molecules were the most intense in the presence of matrix for all studied macrolides. This explains such high matrix effects (up to 351% for neospiramycin) for erythromycin, spiramycin, neospiramycin, tilmicosin and josamycin. Table 5 shows the relative intensities of protonated molecules and the respective sodium adduct ions for erythromycin, spiramycin, neospiramycin, tilmicosin and josamycin in pure solvent and in the presence of matrix. It is important to highlight that such effect could only be explained because QToF spectrometers are able to get full scan spectra.

The quantitative analysis presented adequate linearity, with correlation coefficients (r) of 0.99 for all analytes. Matrix matched calibration curves (Figure 2) guaranteed results reliability.

The results for accuracies and precision were in accordance with the EU decision n° 2002/657 (EC, 2002). Accuracies were within 77 – 109 % interval. Precision was demonstrated from the relative standard deviations in the intra and inter day tests and were lower than 15% for all macrolides at all tested concentrations.

Table 4. HPLC – QToF macrolides quantification method validation results

		Erythromycin	Spiramycin	Neospiramycin	Tylosin	Tilmicosin	Josamycin
Linearity (r)		0.994	0.993	0.997	0.996	0.992	0.995
LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		9	27	18	11	7,3	5,8
LOQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		27	82	54	33	22	17
Accuracy (%)	0.5xMRL	96	88	82	80	97	91
	1.0xMRL	100	84	77	83	85	100
	1.5xMRL	109	88	77	84	95	86
Matrix effect (%)	0.5xMRL	22	149	344	n.s	214	n.s
	1.0xMRL	14	118	351	n.s	160	-18
	1.5xMRL	13	86	299	n.s	165	-9
Precision (%)	0.5xMRL	7	7	6	10	1	7
	intraday 1.0xMRL	2	3	4	6	4	6
	1.5xMRL	3	5	3	3	6	1
	0.5xMRL	6	8	10	13	10	13
	interday 1.0xMRL	14	13	9	7	9	13
	1.5xMRL	5	7	4	3	6	5
CCα ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		65	208	205	104	53	53
CCβ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)		70	216	210	108	55	56

n.s.: not significant at $\alpha=5\%$ **Table 5.** Relative intensities of protonated molecules and the respective sodium adduct ions ($[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{Na}]^+$) in the presence and absence of tilapia fillet matrix.

Macrolide	Matrix present	Matrix absent
Spiramycin	1.28	0.29
Neospiramycin	1.38	0.25
Josamycin	1.21	0.83
Tilmicosin	7.39	4.17
Erythromycin	1.03	0.53

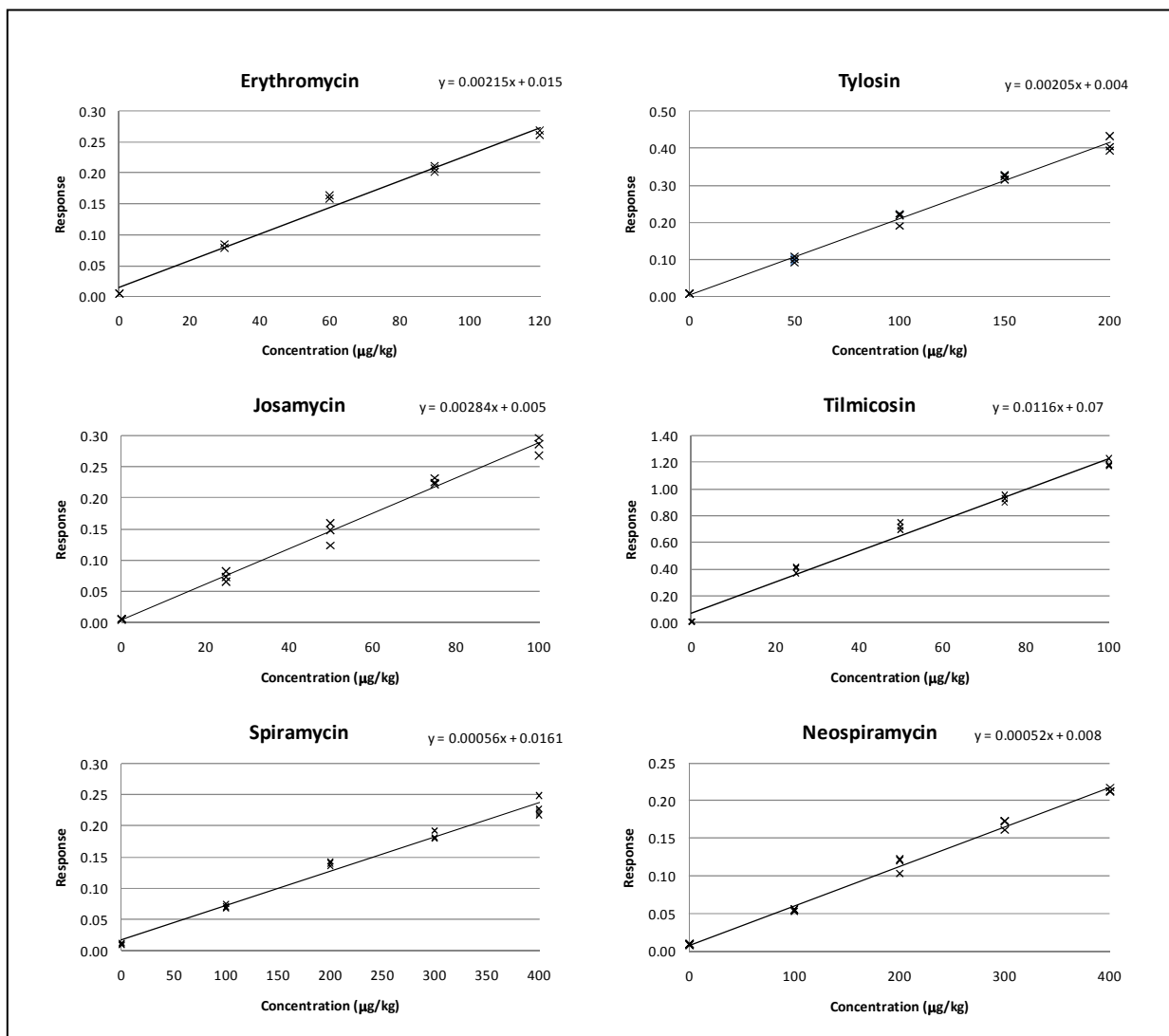


Figure 2. Macrolides matrix-matched calibration curves

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) obtained, were below the adopted MRLs defined for all analytes.

Method selectivity was verified by the absence of interfering peaks in the blank sample extracted mass chromatograms in the time intervals around the retention times of the analytes, as shown in Figure 3.

According to the European Community regulation (EC, 2002), confirmatory methods shall provide information on the chemical structure of the analyte, and MS detection is recognizably capable of that.

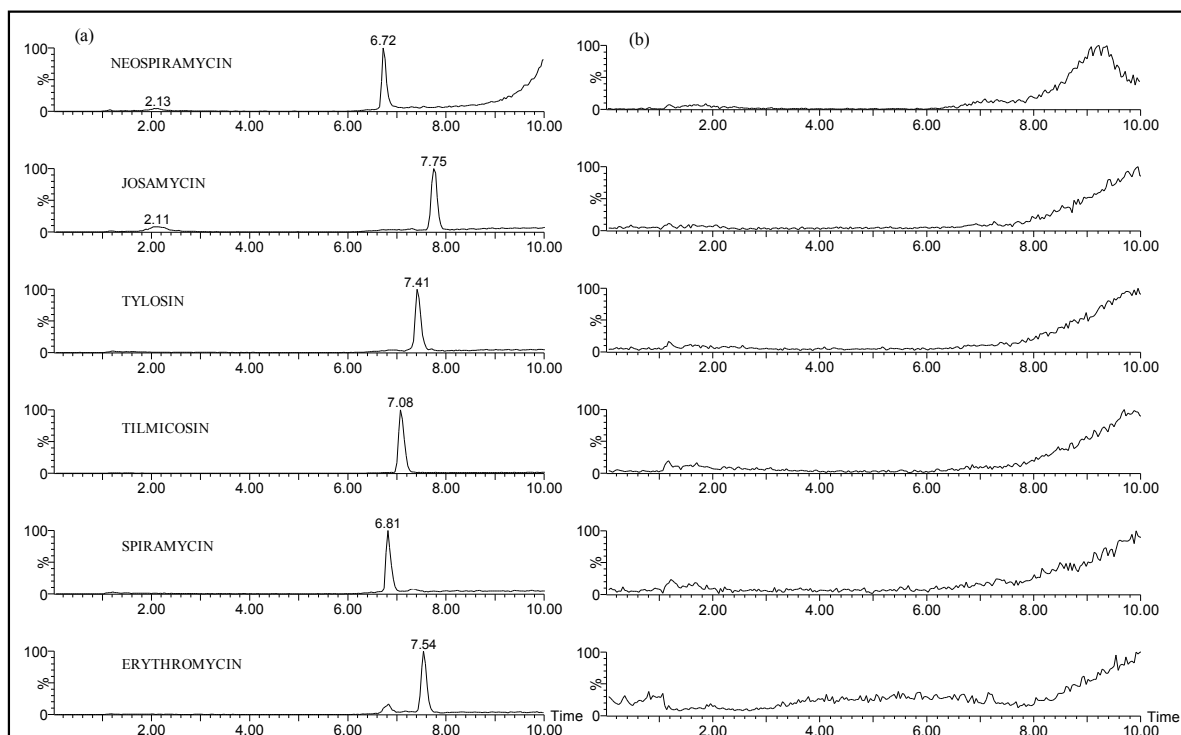


Figure 3. (a) Example of macrolides chromatograms in tilapia fillet matrix (1.5 x MRL) and (b) the respective blank tilapia fillet chromatograms

When mass fragments are measured using other than full-scan techniques, a system of identification points (IPs) shall be used to interpret the data. For the confirmation of prohibited substances, a minimum of 4 identification points are required, and for the confirmation of permitted substances, a minimum of 3 identification points are required.

Although QToF Micro ® provides m/z accuracies with errors of less than 5 ppm, its resolution is less than 10000 and does not reach the European Community criteria for high resolution mass spectrometry. Hence, at least 3 ions must be monitored in MSMS mode in order to reach 3 identification points. Hernandez *et al.*, 2004 stressed a problem that arose with the 2002/657 definition of “high resolution mass spectrometry instruments”. This definition did not consider an important parameter for the confirmation of a chemical contaminant, which is mass accuracy, and disadvantaged instruments with accurate mass capabilities that could not meet the decision’s “high-resolution” definition. Wang, 2007,

proposed an alternative criterion for IPs assignment, where mass errors of less than 2 ppm would lead to 2 IPs per ion; mass errors between 2 and 10 ppm would result in 1.5 IPs per ion and ions with more 10 ppm of errors would render 1 IP.

Following this criterion, only the monitoring of the protonated molecular precursor ion and one fragment would be necessary to get the required IPs for analytes confirmation with QToF Micro ®. Table 6 describes the quantification and confirmation ions monitored in the validated method, the collision energies applied to obtain them, and the resulting IPs for each analyte. Figure 4 presents the fragmentation spectra obtained for each macrolide studied.

Samples from the retail market of São Paulo State (Brazil) were analyzed by the validated method in order to test its applicability. None of the analyzed samples presented positive results (higher than the limits of detection) for the macrolides studied.

Table 6. Macrolides molecular formulas, monoisotopic masses, quantification ions, collision energies applied to obtain fragmentation spectra, confirmation ions and resulting identification points.

	Erythromycin	Spiramycin	Neospiramycin	Tylosin	Tilmicosin	Josamycin
Molecular Formula	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	C ₃₆ H ₆₂ N ₂ O ₁₁	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₅
Monoisotopic mass (Da)	733.4612	842.5140	698.4354	915.5192	868.5660	827.4667
Quantification ion (m/z) [m/z errors in ppm]	734.4691 [0.4]	843.522 [-1,3]	699.443 [1.3]	916.527 [-2.5]	869.5739 [-0.5]	828.4745 [0.5]
Collision energy (V)	20	30	20	30	40	25
IPs*: quantification ion	1	1	1	1	1	1
Identification ions (m/z)	576; 158	540; 174	540; 174	772; 174	696; 174	600; 174
IPs*: identification ions	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
TOTAL IPs*	4	4	4	4	4	4

* according to European commission criteria (EC, 2002)

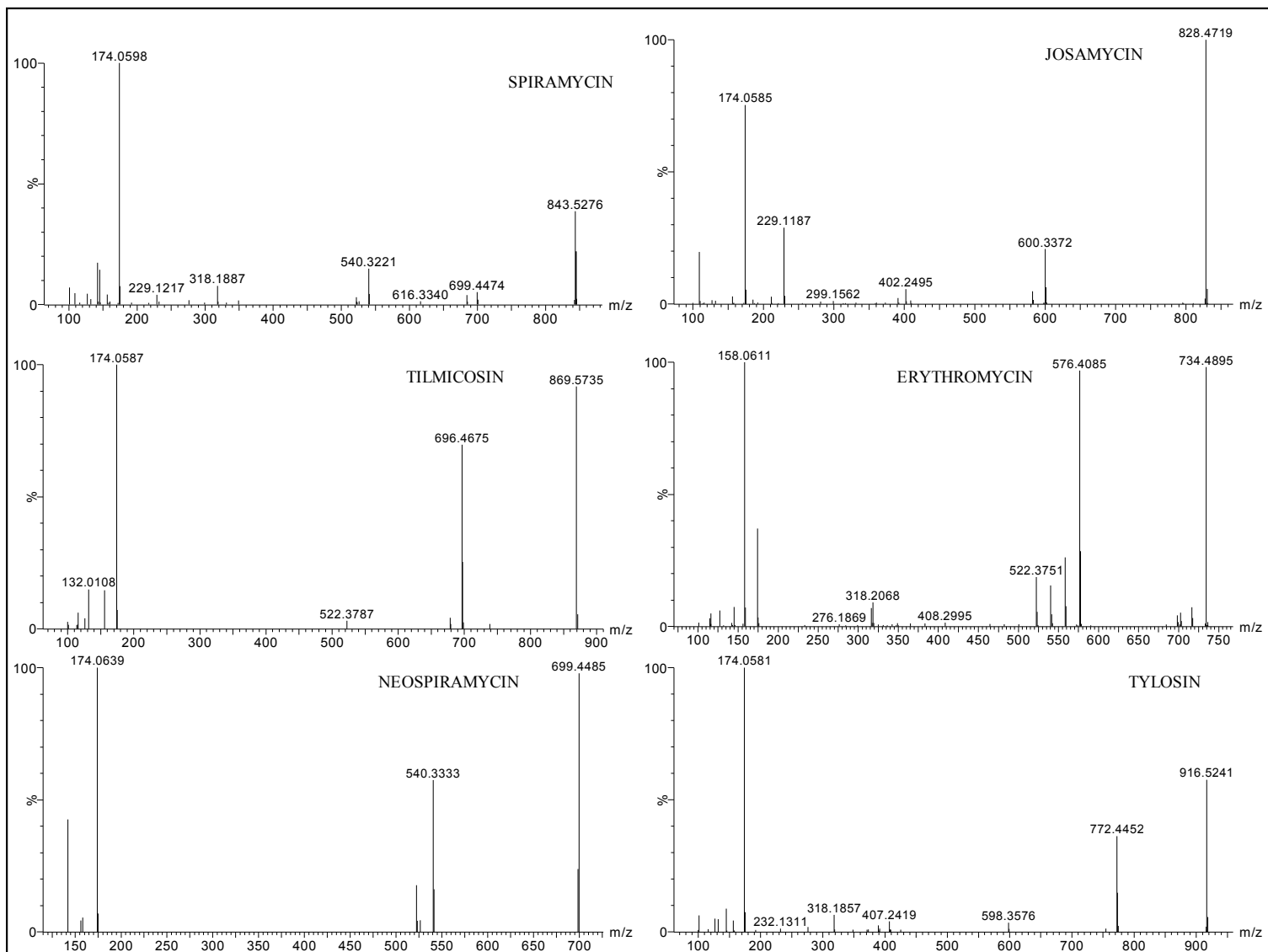


Figure 4. Macrolides fragmentation spectra

Conclusions

The developed LC-QToF method was suitable for the simultaneous identification and quantification of macrolides (erythromycin, josamycin, tilmicosin, tylosin, spiramycin) in tilapia fillets. The obtained validation results were in accordance with the EU recommendations (EC, 2002). The extraction and clean up procedure was simple and resulted in adequate accuracies and precision. The method linearity was adequate, with correlation coefficients of 0.99 for all analytes.

Matrix effect was significant ($\alpha = 5\%$) for all analytes except tylosin, which demonstrates the importance and necessity of matrix matched calibration. The use of a mass spectrometer able to get full mass spectra was important to clarify the matrix effect mechanism, through the difference between protonated molecules and sodium adducts ion ratios in the presence and absence of the matrix.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) proved that the developed method is adequate for the quantification and identification of the analytes in tilapia fillet samples at lower concentrations than the adopted MRLs. The difference between CC α s and MRLs were lower than 10% of the MRL, corroborating the method precision and its ability for application in regulatory analysis.

The method allowed the monitoring of the protonated molecules and two fragment ions for each analyte, achieving the purpose of confirming their identity according to the EU recommendations (EC, 2002). It ought to be mentioned that the EU criteria for identity confirmation of contaminants in food should be revised in order to include mass accuracy parameter.

Although none of the samples from the retail market analyzed presented positive results for macrolides residues, it is necessary to highlight that the number of samples tested was small (n=20) and, consequently, is not representative of the State of São Paulo retail market at all. It is believed that the samples from “fish and pay” establishments would be more susceptible to the presence of contaminants, since these establishments breed fishes of many species in a single tank, normally using antibiotics to prevent the spread of bacterial diseases between them, and are very rarely inspected by sanitary vigilance agencies. It also expected that samples from formal commercial establishments, as the supermarkets, do not present contaminants residues. Nevertheless, further investigation is necessary in order to confirm these expectations.

Abbreviations used

C18	Octadecilsilane
CC α	Decision limit
CC β	Detection capability
dSPE	Dispersive solid phase extraction
EC	European Commission
ESI	Electrospray ionization
HAc	Acetic Acid
HPLC	High performance liquid chromatography
IPs	Identification points
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MeOH	Methanol
MRL	Maximum residue limit

MS	Mass Spectrometry
MSPD	Matrix solid phase dispersion
PSA	Primary secondary amine
PTFE	Polytetrafluorethylene
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Q	Quadrupole mass analyzer
QToF	Quadrupole – time of flight hybrid mass analyzer
RSD	Relative standard deviation
ToF	Time of Flight mass analyzer
WHO	World Health Organization

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from CNPq, CAPES and FAPESP.

Literature Cited

1. European Commission (EC) – COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Communities, **2002**, L221, 8-36
2. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Fishery and Aquaculture Statistics. **2009**, Rome, Italy. [Online]. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1013t/i1013t.pdf> (accessed on November 17, 2010).
3. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Cultured Aquatic Species Information Programme - *Oreochromis niloticus* [Online]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en#tcN90112 (accessed on November 17, 2010)

4. Wang, J. Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices; *Mass Spectrometry Reviews*, **2009**, 28, 50–92
5. Kanfer, I. ; Skinner, M. F. ; Walker, R. B. Analysis of macrolide antibiotics; *J. Chromatogr., A* **1998**, 812, 255-286.
6. Gobel, A. ; McArdeell, C. S. ; Suter, M. J. , Giger, W. Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamidemetabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem. (Washington, DC, U.S.)*, **2004**, 76, 4756 - 4764.
7. Horie M. Chemical analysis of macrolides. In *Chemical analysis for antibiotics used in agriculture*; Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., MacNeil, J.D., Eds.; AOAC International: Arlington, 1995, 165-205.
8. World Organization for animal health (OIE). List of antimicrobials of veterinary importance. Paris, France, May 2007 [Online]. http://www.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf (accessed on December 13, 2010).
9. Codex Alimentarius - Veterinary Drug Residues in Food - Maximum Residue Limits Home Page. http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.jsp (accessed on September 10, 2010).
10. European Medicines Agency. Maximum Residue Limits Reports Home Page. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC0b01ac058006488e (accessed on December 20, 2010).
11. MERCOSUR Resolution N° 054/2000. Brasilia, September, 2000 [Online]. <http://200.40.51.218/SAM/GestDoc/PubWeb.nsf/Normativa?ReadForm&lang=POR&id=48287E473D6D9BD8032576AA0055A7F6> (accessed on January 7, 2011)
12. USDA. United States Department of Agriculture. MRL Data Base Home Page. <http://www.mrldatabase.com/> (accessed on January 5, 2010)

13. MAPA. Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. May 3rd, 2010 Official Union Journal, Section 1, Page 27.
14. The Japan Food Chemical Research Foundation. Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Food Home Page. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html> (accessed on November 11, 2010).
15. FDA. United States Food and Drug Administration – Animal & Veterinary – Aquaculture Approved Drugs [Online]. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm> (accessed on December 17, 2010).
16. Thompson, M.; Stephen, L. R.; Wood, R. Laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835-855.
17. MAPA. Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. July 22nd, 2009 Official Union Journal, Section 1, Page 7.
18. Ribani, M; Bottoli, C. B. G; Collins, C. H; Jardim, I. C. S. F; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* **2004**, 27, 771-780.
19. Hernández, F. ; Ibáñez, M. ; Sancho, J. V. ; Pozo, O. J. Comparison of Different Mass Spectrometric Techniques Combined with Liquid Chromatography for Confirmation of Pesticides in Environmental Water Based on the Use of Identification Points. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4349-4357.
20. Wang, J.; Leung, D. Analysis of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**; 21: 3213–3222

CONCLUSÕES GERAIS

Métodos para a quantificação de macrolídeos em pescados têm sido raramente reportados na literatura. O método para determinação de espiramicina, neoespiramicina, tilosina, tilmicosina, josamicina e eritromicina em filés de tilápias por HPLC-QToF desenvolvido e validado no presente estudo traz como novidade um procedimento simples de extração líquida com etanol seguida de remoção de material graxo por partição com hexano, facilmente replicável em laboratórios de fiscalização. O uso de um espectrômetro de massas híbrido do tipo QToF trouxe vantagens na identificação dos analitos, devido à capacidade de medição de massa exata e, também, permitiu a elucidação da variação nos espectros de massa na presença da matriz, justificando então a calibração por superposição da matriz.

A validação do método mostrou que ele atende às recomendações da União Europeia (EC, 2002) e do MAPA (MAPA, 2009), permitindo o monitoramento das moléculas protonadas dos analitos e de dois íons fragmentos para cada analito no modo MS-MS, o que o enquadra nos requisitos de identificação positiva de contaminantes em alimentos. Os critérios para confirmação de identidade da União Europeia precisam ser revistos, de maneira a incluir a exatidão de massa, e não somente a resolução do espectro, como requisito para a identificação de contaminantes.

Apesar de as amostras analisadas não terem apresentado resultados positivos para os macrolídeos estudados, o número de amostras não é representativo do mercado do Estado de São Paulo. Uma investigação mais profunda, envolvendo um número maior de amostras, se faz necessária para se ter um panorama exato da presença de resíduos destes antimicrobianos nos produtos advindos da aquicultura da tilápia no mercado consumidor.