

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

ANÁLISE DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS ANFENICÓIS E
 β -LACTÂMICOS EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

Mariem Rodrigues Ribeiro da Cunha
Mestre em Bioquímica

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de engenharia de alimentos para a obtenção do título
de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP
2009

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

C914a Cunha, Mariem Rodrigues Ribeiro
Análise de multirresíduos de antibióticos anfenicóis e B-lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência ao detector de massas – Validação intralaboratorial / Mariem Rodrigues Ribeiro Cunha. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Antibióticos. 2. Leite. 3. Validação. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Espectrometria de massa. I. Godoy, Helena teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Analysis of multirresiduos of antibiotics anfenicóis and B-lactam antibiotics in milk by high performance liquid chromatography coupled to mass detector – Validation intralaboratory

Palavras-chave em inglês (Keywords): Antibiotics, Milk, Validation , High performance liquid chromatography, Mass spectrometry.

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Roger Wagner

Jesuí Vergílio Visentainer

Juliana Azevedo Lima Pallone

Cláudia Kowalski

Data de Defesa: 28/07/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

.....
Profª. Drª. Helena Teixeira Godoy
FEA - UNICAMP
Presidente

Dr. Roger Wagner
DTCA - Universidade Federal de Santa Maria
Membro

.....
Prof. Dr. Jesuí Virgílio Visentainer
IQ - Universidade Estadual de Maringá
Membro

.....
Profª. Drª. Juliana Azevedo Lima Pallone
FEA - UNICAMP
Membro

.....
Drª. Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder
LANAGRO
Membro

.....
Prof. Dr. Moacir Evandro Lage
DMV – Universidade Federal de Goiás
Membro

.....
Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA - UNICAMP
Membro

.....
Drª. Regina Prado Zanes
ITAL – Campinas
Membro

***“Nada lhe posso dar se já não existe em você mesmo.
Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua
própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave.
Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo”.***

Hermann Hesse

***Dedico e agradeço especialmente
aos meus pais Firmino e Nair “in memória,”
ao meu filho Filipe e ao Rogério pelo amor,
que me incentivam sempre, e pelos valores
e sonhos compartilhados***

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a **Deus** pela vida, e que sempre me deu forças para continuar caminhando e acreditando e por todas as oportunidades advindas.

À **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, especialmente ao **Departamento de Ciência de Alimentos**, por possibilitar a realização do trabalho.

À **Fundação Ezequiel Dias**, pelo suporte humano, material e financeiro, imprescindível à realização das análises.

À **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)** pelo apoio financeiro.

À **Prof^a. Dra Helena Teixeira Godoy**, que pacientemente me orientou na execução deste trabalho e por ser um exemplo a ser seguido.

À **Prof^a. Dra Lieselotte Joki**, pelo apoio incondicional ao trabalho e exemplo profissional

À **Maria de Fátima Gomides, Cristiane Lúcia Goddard e Giancarlo Ubaldo Nappi** pelo apoio e incentivo ao longo de todo o trabalho.

Aos **Técnicos e Colegas** de trabalho da Fundação Ezequiel Dias, pelo carinho e amizade.

Aos **Membros da Comissão Examinadora**, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade desta tese.

Aos **meus pais** *‘in memória’* pelo amor irrestrito e pelos ensinamentos de valorização do conhecimento transmitidos. À minha querida irmã **Adelaide**,

irmãos, sobrinhos e familiares pela força constante e pelo entendimento de várias horas ausente.

Enfim, a **Todos** que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada

Mariem R. R. Cunha

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xvii
SUMMARY	xix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO 1. RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NO LEITE..	15
Resumo.....	16
Abstract.....	17
1. Introdução.....	17
2. β - Lactâmicos.....	22
2.1. cefalosporinas.....	23
2.2. penicilinas.....	29
3. Anfenicóis.....	33
4. Limites máximos dos resíduos de antibióticos.....	36
5. Características e efeitos dos resíduos de antibióticos no processamento do leite.....	39
6. Métodos de análise para resíduos de antibióticos.....	41
7. Referências Bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 2. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL - QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANFENICÓIS EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS.....	61
Resumo.....	62
Abstract.....	63
1. Introdução.....	64
2. Materiais.....	67
2.1. Reagentes, solventes e materiais diversos.....	67
2.2. Vidrarias.....	68
2.3. Equipamentos.....	68

2.4. Preparo dos Padrões.....	68
2.4.1. Solução padrão estoque dos anfenicóis.....	68
2.4.2. Solução padrão intermediária I de anfenicóis.....	68
2.4.3. Solução intermediária II de tianfenicol.....	69
2.4.4. Solução de pool do padrão de anfenicóis.....	69
2.4.5. Solução de pool de padrões de anfenicóis para o efeito matriz..	69
2.5. Preparo de Reagentes.....	69
2.5.1. Solução de extração - Tampão McIlvaine modificado.....	69
2.5.2. Solução de limpeza.....	70
2.5.3. Solução de ácido fórmico e tampão formiato.....	70
2.6. Amostra.....	70
3. Métodos.....	670
3.1. Extração e purificação.....	71
3.2. Etapa cromatográfica.....	71
4. Validação.....	72
4.1. Seletividade.....	72
4.2. Linearidade.....	72
4.3. Efeito Matriz.....	73
4.4. Exatidão e Precisão.....	73
4.5. Limite de detecção e quantificação do equipamento.....	74
4.6. Limites de detecção e de quantificação do método.....	75
4.7. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	75
5. Resultados e discussão.....	75
5.1. Seletividade.....	75
5.2. Linearidade e Efeito Matriz.....	78
5.3. Exatidão e precisão.....	87
5.4. Limites de detecção e quantificação do método.....	88
5.5. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do Método....	88
6. Conclusões.....	89
7. Referências Bibliográficas.....	89

CAPÍTULO 3. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL - IDENTIFICAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÂMICOS EM LEITES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS.....	95
Resumo.....	96
Abstract.....	97
1. Introdução.....	98
2. Materiais.....	99
2.1. Reagentes, solventes e materiais diversos.....	99
2.2. Vidraria.....	100
2.3. Equipamentos.....	100
2.4. Preparo dos padrões.....	100
2.4.1. Solução padrão estoque dos β -lactâmicos.....	100
2.4.2. Solução padrão intermediária I de β -lactâmicos.....	100
2.4.3. Solução padrão intermediária II de β -lactâmicos.....	101
2.4.4. Pool de solução padrão de β -lactâmicos A (fortificação das amostras antes da extração).....	101
2.4.5. Pool de solução padrão de β -lactâmicos B (fortificação das amostras depois da extração) – Efeito matriz.....	101
2.4.6. Pool de solução padrão de β -lactâmicos C (Limite de detecção do equipamento).....	102
2.4.7. Pool de solução padrão de β -lactâmicos D (limite de detecção do método).....	102
2.5. Preparo da Amostra de Leite Fluido controle.....	102
3. Métodos.....	103
3.1. Extração e purificação da amostra de leite controle.....	103
3.2. Condições analíticas para CLAE/EM dos β -lactâmicos.....	103
4. Validação.....	104
4.1. Seletividade.....	104
4.2. Limite de detecção do equipamento.....	105

4.3. Limite de Detecção do Método.....	105
4.4. Estudo do efeito Matriz.....	105
5. Resultados e Discussão.....	106
5.1. Seletividade.....	106
5.2. Limite de Detecção do Equipamento e do Método.....	110
6. Conclusões.....	111
7. Referências Bibliográficas.....	112
CAPÍTULO 4. ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANFENICÓIS E IDENTIFICAÇÃO DE β-LACTÂMICOS EM LEITES INTEGRAIS UHT E EM PÓ POR CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA EM DETECTOR DE MASSAS.....	115
Resumo.....	116
Abstract.....	117
1. Introdução.....	118
2. Materiais.....	121
2.1. Reagentes, solventes e materiais diversos.....	121
2.2. Vidraria.....	122
2.3. Equipamentos.....	122
2.4. Preparo dos Padrões.....	122
2.4.1. Solução padrão estoque dos anfenicóis.....	122
2.4.2. Solução padrão intermediária I de anfenicóis.....	122
2.4.3. Solução intermediária II de tianfenicol.....	123
2.4.4. Solução de pool do padrão de anfenicóis.....	123
2.4.5. Solução de pool de padrões de anfenicóis para o efeito matriz..	123
2.4.6. Solução padrão estoque dos β -lactâmicos.....	123
2.4.7. Solução padrão intermediária I de β -lactâmicos.....	124
2.4.8. Solução padrão intermediária II de β -lactâmicos.....	124
2.4.9. Pool de padrões de β -lactâmicos A (fortificação das amostras antes da extração).....	124
2.4.10. Pool de padrões de β -lactâmicos B (fortificação das amostras	

depois da extração)-Efeito matriz.....	125
2.4.11. Pool de padrões de β -lactâmicos C (limite de detecção do equipamento).....	125
2.4.12. Pool de padrões de β -lactâmicos D (limite de detecção do método).....	125
2.5. Preparo de Reagentes.....	126
2.5.1. Solução de extração - Tampão McIlvaine modificado.....	126
2.5.2. Solução de limpeza.....	126
2.5.3. Solução de ácido fórmico e tampão formiato.....	126
2.5.4. Reagentes e padrões para os ensaios com Kit.....	126
2.5.5. Solução padrão estoque e trabalho de β - lactâmico.....	126
2.5.6. Leite de referência Skim Milk.....	127
2.6. Amostragem.....	127
3. Métodos.....	128
3.1. Triagem de β - Lactâmicos em Leite Fluido por Kit SNAP.....	128
3.2. Triagem de cloranfenicol por Kit ELISA - Leite UHT integral.....	128
3.3. Análise por CLAE/EM.....	129
3.3.1. Anfenicóis.....	130
3.3.2. β -lactâmicos.....	131
4. Resultados e Discussão.....	131
5. Conclusões.....	137
6. Referências Bibliográficas.....	137
CONCLUSÕES GERAIS.....	141
SUGESTÕES.....	143
ANEXO I. Cromatogramas e Espectros de massas de β-Lactâmicos Modo Positivo – padrões individuais.....	145
ANEXO II. Cromatogramas e Espectros de massas de β-Lactâmicos Modo Negativo – padrões Individuais.....	150
ANEXO III. Cromatogramas e Espectros de massas de β-Anfenicóis Modo Negativo – padrões individuais.....	152

RESUMO GERAL

A presença de resíduos de antibióticos no leite resulta da aplicação de diferentes substâncias antimicrobianas no gado leiteiro para o tratamento de infecções e uso profilático na prevenção de doenças e como aditivos adicionados à ração para promover o crescimento do animal. A utilização indiscriminada dos antibióticos pode estar associada à presença de resíduos no leite e em seus derivados acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos. A demanda por um controle da qualidade deste produto levou a necessidade de métodos analíticos confiáveis que permitam avaliar o teor desses resíduos, visando garantir a qualidade dos alimentos, a segurança do consumidor e o reconhecimento mútuo a nível internacional. Esta pesquisa descreve o procedimento de validação intralaboratorial de um método para identificar e quantificar resíduos de anfenicóis e de treze antibióticos da classe dos β -lactâmicos em leite UHT e em pó integrais por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE/EM), de acordo com os critérios de validação preconizados pela Diretiva 2002/657/EC. Foram analisadas 475 amostras de leites integrais UHT e 140 em pó, perfazendo um total de 615 amostras. A coleta foi realizada pela Vigilância Sanitária dos estados de MG, RJ, SP, PR, RS, SC, ES, GO, MS, BA, PA e RO no período de julho/2006 a junho/2007. As amostras foram previamente submetidas ao ensaio de Kit SNAP e Kit ELIZA para cloranfenicol e β -Lactâmicos, respectivamente. O método por CLAE/EM foi utilizado para confirmar quantitativamente os antibióticos cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol, e qualitativamente os β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilinas G e V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefoperazone e ceftiofur). Observou-se que 0,65% do total de amostras de leite UHT foram confirmadas, enquanto na triagem 4,11% foram reagentes. Para o leite em pó somente 1,44% do total de amostras foram confirmadas para florfenicol, enquanto na triagem 30,9% das amostras foram reagentes. Na triagem foi detectada a presença de resíduos de β -lactâmicos em 3 amostras de leite UHT e 3 amostras de leite em pó. Em todas foi confirmada a presença do resíduo de cefapirina, representando, respectivamente, 0,65% e 2,14% do total das amostras. Os resultados mostraram que o método desenvolvido apresentou eficiência satisfatória ao uso pretendido.

SUMMARY

The presence of antibiotic residues in milk resulting from the application of various antimicrobial substances in dairy cattle for the treatment of infections and prophylactic use in prevention of disease, before or after exposure, and added to feed additives to promote growth of the animal. Their indiscriminate use can be associated to the presence of residues in the milk and milk derivatives above the Maximum Limits of Residues (LMR) allowed. The demand for a control of the quality of this product, took to the development of reliable analytic methods that allow to evaluate the residue of antibiotics seeking to guarantee the quality of the victuals, the consumer's safety and the mutual recognition at international level. This study describes the procedure for intralaboratory validation of the method to identify and quantify residues amphenicols and thirteen antibiotics of the class of β -lactams in UHT and powder milk by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer. They were analyzed 475 UHT milk samples and 140 powder milk samples, covering a total of 615. The collection was carried by the Sanitary Surveillances of States of MG, RJ, SP, Pr, RS, SC, ES, GO, MS, BA and PA in the period from July 2006 to June 2007. The samples were previously submitted to Kit SNAP rehearsal and of Kit ELISA for chloranphenicol and β -lactamics respectively. The method of high performance liquid chromatography coupled with simple quadrupole mass detection (HPLC/MS) it was used to confirm quantitatively the chloranphenicol, thiamphenicol and florphenicol antibiotics and qualitatively the β -lactamics ampicillins, amoxicillin, cloxacillin, oxacillin, penicillins G and V, cephalixin, cephalothin, cefoperazone and ceftiofur antibiotics. It was found that 0.65% of total samples of milk were confirmed, while 4.11% were in the screening reagents. For milk powder only 1.44% of total samples were confirmed to florphenicol, while 30.9% in the screening of samples were reactive. Sorting to detected in the presence for residues of β -lactamics in three samples of milk and three samples of milk powder. In all samples the cephalixin, a β -lactamics class of cephalosporins, was confirmed, representing respectively 0.65% and 2.14 of total samples. The results showed that the method developed showed satisfactory performance to intended use.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente, a agricultura mundial foi impulsionada significativamente nos anos 60 e 70 com a chamada “revolução verde” quando as práticas até então camponesas foram substituídas pela de mecanização, correção e fertilização do solo, pelo emprego de agrotóxicos e quimioterápicos contra pragas e doenças, e para promover o crescimento. Fatos esses que impeliram a produção mundial de alimentos para patamares nunca antes experimentados (COMERÓN & ANDREO, 2000).

Assim, a inserção de animais aos sistemas agrícolas, que antes era definida pela disponibilidade de alimentos e pelo clima, passou, na produção intensiva, a ser feita a partir do manejo das instalações e o nicho alimentar, substituído pela ração industrialmente formulada (KHATOUNIAN, 1998; MOURA, 2000). Como reflexos negativos dessas práticas, ainda nos anos 70, surgiram as erosões e as contaminações de mananciais e solos. Nos anos 80, práticas menos agressivas ao ambiente passaram a ser experimentadas e adotadas (NEVES, 2000).

Na década de 90, os efeitos colaterais prejudiciais advindos da chamada “revolução verde” acarretaram movimentos em diferentes partes do mundo evidenciados, principalmente, com o evento “Rio-92 – Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento”, quando se reconheceu a importância de caminhar para a sustentabilidade. Paralelamente, a agricultura recebeu grande impacto em função das crises envolvendo a cadeia alimentar, entre elas, os surtos de febre aftosa e de encefalopatia espongiforme bovina ou doença da vaca-louca, seguidos pelos efeitos dos alimentos geneticamente modificados, das contaminações microbiológicas, da resistência bacteriana a antibióticos utilizados sem devido controle na produção animal, dos pesticidas, dos hormônios. Esses episódios culminaram com a elaboração e aplicação de uma política de controle de qualidade dos alimentos destinados ao consumo (JACCLOUD, 1998).

De acordo com BOUTRIF (1998) a garantia da segurança alimentar e a redução de obstáculos ao comércio devem ser realizadas por um processo de harmonização das regulamentações sobre alimentos, padrões de qualidade e de

orientações normativas. Além disso, é importante o controle dos animais que dão origem a alimentos para o homem – que deve ser realizado por todos os países, tanto internamente quanto externamente – visando o estabelecimento de normas e legislações. Assim, no final de 1980 e início de 1990, surgiram os paradigmas da sustentabilidade e da qualidade total, evidenciando a preocupação da população com os problemas relacionados com a ingestão de alimentos contaminados. Segundo BRANDÃO (2001), a produção de alimentos seguros, saudáveis e nutritivos e em bases sustentáveis e competitivas é um dos fundamentos da segurança alimentar. Ou seja, deve-se garantir que a população tenha acesso a alimentos imprescindíveis a sua nutrição, o que inclui tanto a produção como o abastecimento e a comercialização.

BRESSAN et al. (2000) relataram que a sustentabilidade e a competitividade são conceitos complementares e têm tudo a ver com a segurança alimentar, especialmente em sua dimensão relacionada com a expansão da oferta de alimentos, por parte dos produtores. Não é em vão que a Organização para Agricultura e Alimentação (FAO), ligada à Organização das Nações Unidas (ONU), define segurança alimentar, conforme BELIK (2003), como:

“Uma situação na qual todas as pessoas, durante todo o tempo, possuam acesso físico, social e econômico a uma alimentação suficiente, segura e nutritiva, que atenda a suas necessidades dietárias e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável.”

Obviamente, o conceito de segurança alimentar reafirma “... o direito inquestionável de todo o cidadão a uma alimentação de qualidade e em quantidade suficiente em todas as fases de sua vida” (LAVINAS & NABUCO, 1996).

Assim, a reforma estrutural com estabilização econômica, o consistente aumento no nível de demanda nacional, a liberalização e abertura econômica, a nova regulamentação do MERCOSUL, publicada em 1994, e o acordo sobre a aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias provocaram mudanças fundamentais no sistema agroindustrial, principalmente no do leite (BORTOLETO & WILKINSON,

1999). Como marco desta mudança, destaca-se o *Codex Alimentarius* (1963), criado pelas FAO e WHO (World Health Organization), e a ONU, responsáveis pelos programas mundiais de saúde e alimentação, cujo objetivo é criar regras que estabelecessem padrões confiáveis de produção e manipulação de alimentos para garantir a qualidade sanitária destes.

Consequentemente, o mercado consumidor busca, além da questão sanitária, alimentos de melhor qualidade nutricional. Nesse contexto, o leite é um dos produtos alimentícios mais importantes da agropecuária, em razão da sua estratégia no balanceamento das dietas dos humanos e de seu relevante papel econômico e social. Segundo BEHMER (1984), o leite é um líquido secretado pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos, um pouco antes e principalmente após o parto. Entretanto, LUQUET (1991) afirmou que, em 1909, o “Congresso Internacional de Fraudes” definiu o leite como sendo “... o produto íntegro da ordenha total e sem interrupção de uma fêmea leiteira em bom estado de saúde, bem alimentada e sem sofrer cansaço, isenta de colostro, recolhido e manipulado em condições higiênicas”.

Qualquer que seja a definição adotada, o leite é um dos poucos alimentos consumidos na sua forma natural que apresenta a composição mais completa sob o aspecto nutricional. Com suas características organolépticas próprias, o leite possui coloração que vai desde a cor branca à levemente amarelada, dependendo do seu teor de pigmentos carotenóides lipossolúveis. Quanto à composição química, são constituintes em abundância a água, lactose, gordura e proteínas, e como micronutrientes as vitaminas, enzimas e pigmentos. Assim, desde seu aparecimento, apresenta-se quase indissociável da alimentação humana, sendo assim, deve apresentar condições sanitárias adequadas, estando isento de qualquer forma de contaminação ou substâncias estranhas (LUQUET, 1991; PALMQUIST et al., 1993; TORII et al., 2004).

A produção, o processamento, a distribuição e o consumo do leite induzem alterações bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas, nutricionais, sensoriais e reológicas que podem comprometer a qualidade do produto final. A obtenção de leite que apresente a composição química dentro dos parâmetros de qualidade tornou-se um dos pilares sustentáveis no desenvolvimento dos produtos agropecuários.

Portanto, a importância da ciência e da tecnologia dos alimentos na melhoria da qualidade de vida do homem é ressaltada pela vital necessidade de se ter alimentos com alto valor nutricional, disponíveis à população (GRUMER, 1991; MURPHY et al., 1995; GRIINARI & BAUMAN, 1999).

Segundo FONSECA et. al. (2001), é preciso ter em mente que nenhum processamento a que o leite seja submetido é capaz de superar a importância da qualidade da matéria prima original, o que delega ao produtor a responsabilidade principal pela qualidade final do produto. Para esses mesmos autores, o leite deve ter qualidade tanto em seus aspectos organolépticos como físico-químicos. São parâmetros indicadores da qualidade do leite: ausência de agentes patogênicos, reduzida carga bacteriana, baixa contagem de células somáticas, ausência de contaminantes como antibióticos e pesticidas, adição de água e presença de sujidades. Esses indicadores estão fortemente relacionados com o rendimento industrial e com a qualidade final do produto.

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo (**Figura 1**), crescendo a uma taxa anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares e responde por 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul.

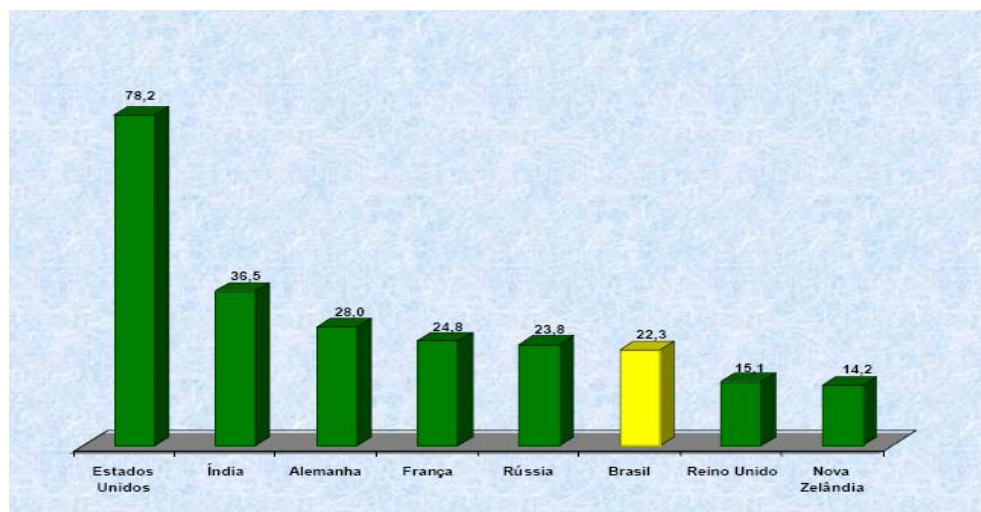


Figura 1: Percentual de produção mundial de leite em 2003.
Fonte: ALVIM, 2005.

Em 2003, o valor bruto da produção agropecuária foi de 84 bilhões de reais. Destes, aproximadamente 35 bilhões de reais são de produtos pecuários, tendo o leite posição de destaque, com o valor de 6,6 bilhões de reais, ou 19% do valor bruto da produção pecuária, superado apenas pelo valor da produção da carne bovina. Nas **Figuras 2 e 3** observam-se o percentual de crescimento da produção do leite no Brasil, no período de 1993 a 2004, e o percentual em relação aos demais países produtores, respectivamente. Constatam-se também que, nos últimos dez anos, a região que apresentou maior taxa percentual de crescimento foi a região Norte, seguida pelo Centro-Oeste, Sul, Nordeste e Sudeste, e aquela que obteve um percentual de distribuição maior foi a Centro-Oeste (**Figuras 4 e 5**).

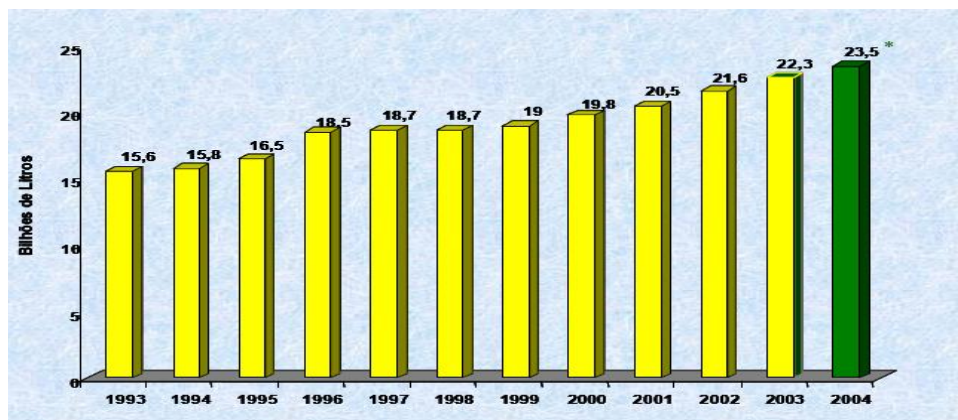


Figura 2: Percentual de crescimento da produção de leite no Brasil.
Fonte: ALVIM, 2005.

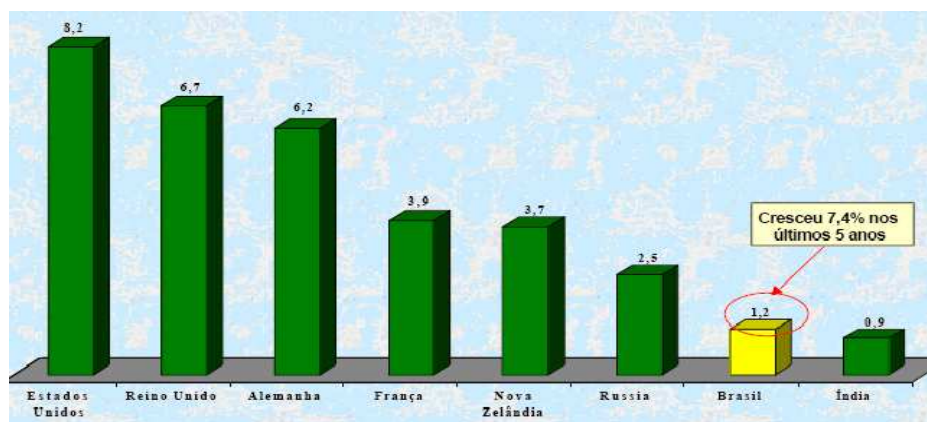


Figura 3: Percentual de produtividade de leite no mundo.
Fonte: ALVIM, 2005.

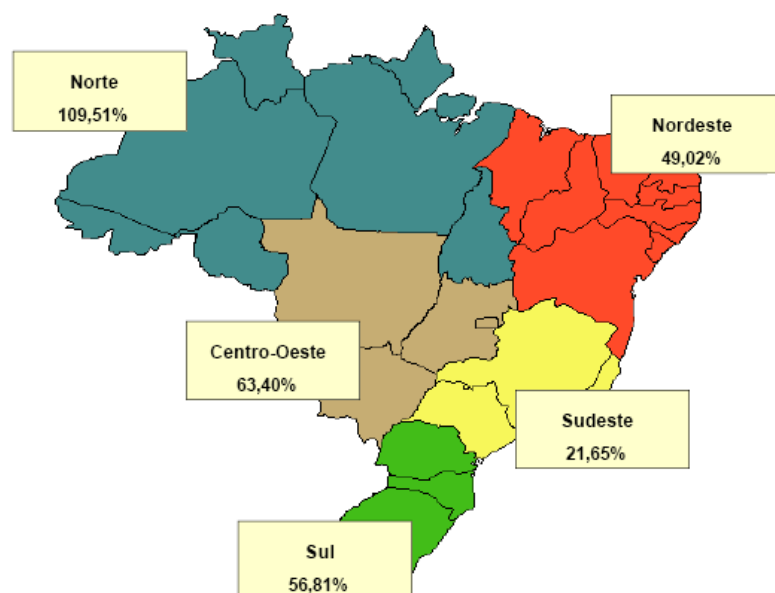


Figura 4 – Produtividade do leite por regiões do Brasil no período de 1993 a 2003.
Fonte: ALVIM, 2005.

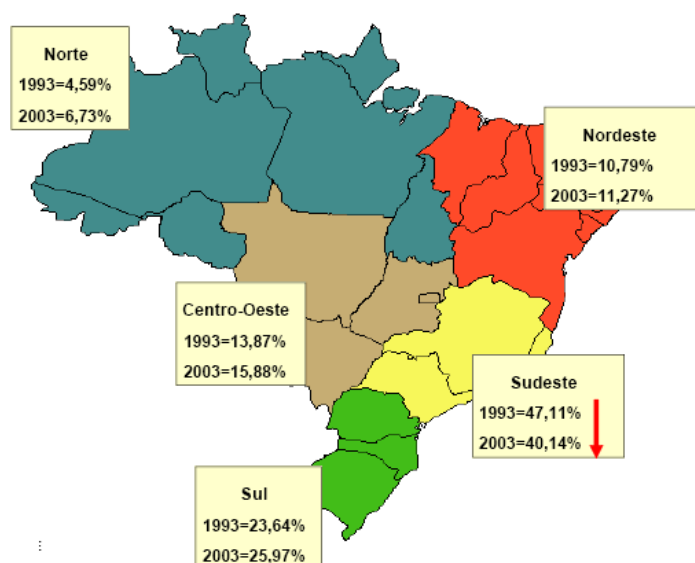


Figura 5 – Distribuição do leite por regiões do Brasil.
Fonte: ALVIM, 2005.

Aliado a este crescimento, o leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando a frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz (**Figura 6**).

Além da importância nutricional e econômica, o leite desempenha um relevante papel social, principalmente na geração de empregos. O país tem hoje acima de um milhão e cem mil propriedades que exploram leite, ocupando diretamente 3,6 milhões de pessoas.

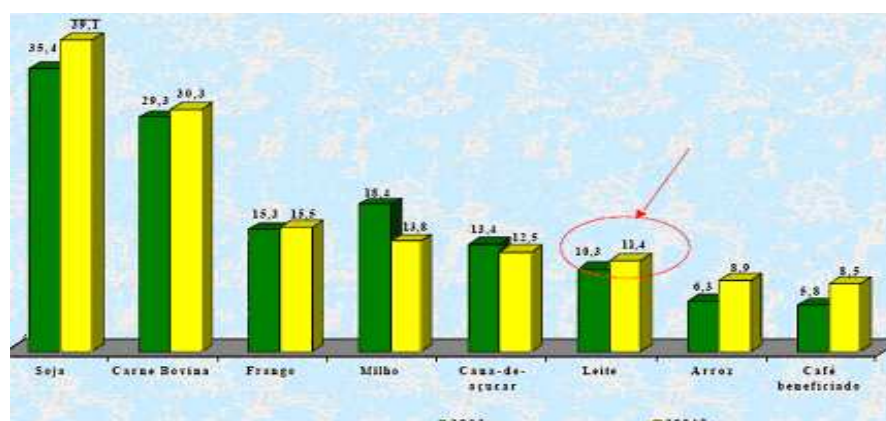


Figura 6 – Percentual de produtividade do leite, 2003 a 2004.
Fonte: ALVIM, 2005.

Para se ter uma idéia mais objetiva do impacto deste setor na economia nacional, a elevação na demanda final por produtos lácteos em um milhão de reais gera 197 empregos permanentes (MARTINS et al., 2001). Esse impacto supera o de setores tradicionalmente importantes como o automobilístico, a construção civil, o siderúrgico e o têxtil (**Tabela 1**).

Assim, o Brasil instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), modificado pela Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999a). Esta estabelece a necessidade da melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal colocados à disposição da população brasileira e, secundariamente, proporcionarem à nação condições de se adequar, do ponto-de-vista sanitário, às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio

(OMC) e órgãos auxiliares, como FAO, WHO e OIE (Office Internacional des Epizooties).

Tabela 1 – Geração de emprego em diversos seguimentos da indústria no Brasil.

Setores	Empregos gerados na economia
Indústria de laticínios	197
Fabricação de calçados	191
Celulose, papel e gráficos	151
Instituições financeiras	141
Peças e outros veículos	129
Construção civil	128
Máquinas e equipamentos	126
Indústria têxtil	123
Material elétrico	122
Siderurgia	116
Petróleo e gás	107
Automóveis/caminhões e ônibus	102

Fonte: MARTINS et al. (2001).

Neste contexto, e diante da necessidade de mudar os paradigmas de desenvolvimento da cadeia alimentar do leite, o Ministério da Agricultura estabeleceu, pela Portaria nº 166 (BRASIL, 1998), um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor leiteiro no Brasil. Este grupo criou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), por intermédio da Portaria nº 56/1999b. Com a publicação da Instrução Normativa nº-51 (BRASIL, 2002), objetivou-se a melhoria na qualidade do leite produzido no Brasil, determinando-se novas normas na produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado. Paralelamente, o surgimento das ferramentas da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) para as indústrias e as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) para o setor primário, além do sistema de Análise e Pontos Críticos de Controle (HAPCC), destacaram-se como uma estratégia para a melhora na qualidade do leite.

Outro incentivo à modernização da produção leiteira no Brasil ocorreu em 2003, pela Resolução nº 3.088 (BRASIL, 2003a) que aprovou o financiamento de

equipamentos de resfriamento e coleta a granel para produtores de leite. A principal razão de todas estas medidas foi a necessidade de adequação do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), publicado no Decreto-Lei nº 30.691 (BRASIL, 1952), às atuais realidades de produção e consumo de leite no Brasil. Além disto, o Ministério da Saúde, pela Resolução RDC nº 253, (BRASIL, 2003b), criou oficialmente o Programa de Monitoramento de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet), visando o fortalecimento de ações efetivas de vigilância sanitária em relação ao monitoramento e vigilância de resíduos químicos em alimentos.

Segundo o Codex Alimentarius, resíduo de medicamentos veterinários é a fração da droga administrada, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados. A presença destes resíduos no leite resulta do uso inadequado do medicamento veterinário e/ou da contaminação accidental durante o transporte ou armazenamento.

Os critérios de seleção para estudar um determinado medicamento são baseados no potencial de exposição da população, no uso inadequado, na toxicidade do resíduo, na disponibilidade de metodologia analítica, nos problemas para a saúde pública e sua ocorrência constitui barreiras às exportações.

Diferentes tipos de antibióticos e suas combinações são utilizados no gado leiteiro, para tratar de doenças (terapêutico), prevenir contra enfermidades (profilático) e melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento). Sua monitorização é importante na área da saúde pública, porque pode, em primeiro lugar, gerar um aumento da resistência bacteriana e, em segundo, existir a possibilidade de desenvolver reações tóxicas ou alérgicas em indivíduos susceptíveis. A resistência bacteriana pode acontecer pela transferência via alimento de bactérias resistentes ao homem, provenientes de animais tratados com antibióticos ou infectados pela bactéria resistente e/ou pela transferência do fator de resistência (fator-R) de bactérias não-patogênicas resistentes a outras bactérias.

Na indústria de laticínios, além dos aspectos citados anteriormente, o controle de resíduos de antibióticos está associado ao fator da qualidade devido à possibilidade de inibição das culturas lácteas utilizadas no fabrico de produtos

fermentados como o iogurte, leites fermentados, manteiga e queijo, levando à rejeição do leite e de seus produtos lácteos. Assim sendo, com base no conceito de segurança alimentar, as principais metas do PNCR e do PAMVet (BRASIL, 1999a; 2003b) foram estabelecidas para assegurar o uso correto dos medicamentos veterinários, de acordo com as práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de aumento da produção e da produtividade pecuária. A determinação dos resíduos de medicamentos deverá ser realizada através de metodologias analíticas precisas e validadas, internacionalmente aceitas e sujeitas ao controle de qualidade analítica, tudo isto no sentido de garantir a inocuidade dos alimentos ofertados ao consumo quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários.

Apesar dos avanços observados na cadeia produtiva do leite no Brasil, durante a década de 90, alguns aspectos associados à melhoria da qualidade do produto ainda representam desafios a serem superados (GOMES, 2002; BRITO et al., 2003). Esses se pautam, principalmente, nos medicamentos e/ou compostos químicos aos quais os animais ficam expostos e que deixam no leite resíduos considerados perigosos à saúde humana e animal. No entanto, mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente atingem essa condição quando ultrapassam o valor estabelecido como Limite Máximo de Resíduo (LMR) que o alimento pode conter, sem prejuízo da integridade orgânica de seres humanos e animais.

Dessa forma, se propôs nesta pesquisa desenvolver, otimizar e validar uma metodologia de análise de multirresíduos de antibióticos β -lactâmicos, formados pelas penicilinas (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina G e V) e pelas cefalosporinas (cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur), e anfenicóis (cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol) em leites integrais UHT e em pó.

2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIM, R.S.A. Cenários atuais e perspectivas para produção de leite. Palestra, Castro, Paraná, agosto, 2005. Disponível em: <http://www.faep.com.br/conseleite>. Acessado em janeiro de 2009.
- BEHMER, M.L. **A tecnologia do leite - produção, industrialização, análise**. 10º ed. São Paulo, Nobel, 1984. 107 p.
- BELIK, W. **Segurança alimentar: a contribuição das universidades**. São Paulo: Instituto Ethos, 2003. 88 p.
- BORTOLETO, E., WILKINSON, J. **Trajetória e demandas tecnológicas nas cadeias agroalimentares do Mercosul ampliado - Lácteos**. Projeto Global. Série Resúmenes Ejecutivos no. 5. Montevideo: PROCISUR, 1999. 9 p.
- BOUTRIF, E. Food safety control in the international framework. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS - Quality and risk management, 25, 1998, Aarhus. **Anais ... Aarhus**: IDF, 1998. p. 199-209.
- BRANDÃO, S.C.C. Segurança alimentar com foco no consumidor final. In: VILELA, D., MARTINS, C.E., BRESSAN, M. CARVALHO, L.A. (Ed.) Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar. Goiânia: CNPq; **Serrana Nutrição Animal**; Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 39-46.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, 7 jul. 1952. p. 10.785.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 dez. 1999. Seção 1, p. 213.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos

- de produção, identidade e qualidade dos leites tipos A, B, C, pasteurizado, cru e refrigerado e aprova o regulamento da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União, Brasília**, 21 set. 2002. Seção 1, p. 13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 166, de 05 de maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade... **Diário Oficial da União**, Brasília, 6 maio 1998. Seção 1, p. 42.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Resolução nº 3.088, de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo à mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado... **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 jun 2003a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003b.
- BRESSAN, M., MARTINS, C.E., VILELA, D. (Ed.) *Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil. Anais do 2º Simpósio* - 2000, Goiânia. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Goiânia: CNPq/Serrana Nutrição Animal, 2000. 206 p.
- BRITO, M.A.V., PORTUGAL, J.A., DINIZ, F.H., FONSECA, P.R., ANGELO, F.F., PORTO, M.A.C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. In: MARTINS, C.E., FONSECA, P.C., BERNARDO, W.F., CÓSER, A.C., FRANCO, P.R.V., PORTUGAL, J.A.B., CARVALHO, F.S. (Ed.) **Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para produção de leite em bases sustentáveis**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 19-32.
- COMERÓN, E.A.; ANDREO, N.A. Produção, industrialização e comercialização do leite orgânico na Argentina. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NO BRASIL, 2, 2000, Goiânia. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p.146-174.
- FONSECA, L.F.L., SANTOS, M.V., PEREIRA, C.C. Qualidade higiênica do leite: efeitos sobre a qualidade dos produtos lácteos e estratégias de controle. In:

- VILELA, D., MARTINS, C.E., BRESSAN, M., CARVALHO, L.A. (Ed.) **Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 184.
- GOMES, M.F. Modernização do sistema de inspeção sanitária federal de leite e derivados e os programas de segurança alimentar. In: PORTUGAL, J.A.; NEVES, B.S., OLIVEIRA, A.C.S., SILVA, P.H.F., BRITO, M.A.V.P. (Ed.) **Segurança alimentar na cadeia do leite**. Juiz de Fora: Epamig/Instituto de Laticínios Cândido Tostes/ Embrapa Gado de Leite, 2002. p. 115-179.
- GRINARI, J.M., BAUMAN, D.E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: **Conjugated linoleic acid: biochemical and nutrition clinical, cancer, and methodological aspects**. Champaign: AOCS, 1999. p. 180-200.
- GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3228-3243, 1991.
- JACCOUD, R.L. Managing change in food safety. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS - Quality and risk management, 25, 1998, Aarhus. **Anais...** Aarhus: IDF, 1998. p. 229-236.
- KATHOUNIAN, C.A. O ecossistema como modelo produtivo do pequeno agricultor. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, n. 22, p. 71-88, 1998.
- LAVINAS, L., NABUCO, M.R. Segurança alimentar: uma nova questão de cidadania. In: CAVALCANTI, J. E. A.; VIEIRA, W. C. (Ed.) **Política agrícola e segurança alimentar**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. p. 67-75.
- LUQUET, F.M. (Coord.) **Leche y productos lacteos: Vaca, oveja, cabra**. Zaragoza: Acribia, 1991. v. 1: p. 343 -360.
- MARTINS, C.E., BRESSAN, M., VILELA, D., CARVALHO, L.A. (Ed.) **Sustentabilidade de sistemas de produção de leite a pasto e em confinamento**. Anais do 3º Minas Leite, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 163 p.
- MOURA, L.G.O. O ecossistema como referência para o sistema produtivo da agropecuária orgânica e o mercado orgânico. In: **Congresso Nordestino de**

Produção Animal, 2º Simpósio Nordestino de Alimentação de Ruminantes.

Anais... Teresina, 2000. v. 1, p. 155-164.

MURPHY, J.J., CONNOLLY, J.F., MCNEILL, G.P. Effects on cow performance and milk fat composition of feeding full fat soyabeans and rapeseed to dairy cows at pasture. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 13-25, 1995.

NEVES, M.C.P. **Projeto estratégico de apoio à agricultura orgânica**: agricultura orgânica como ferramenta para a sustentabilidade dos sistemas de produção e valoração de produtos agropecuários. Brasília: Embrapa, 2000. 32 p.

PALMQUIST, D.L., BEAULIEU, A.D., BARBANO, D.M. Milk fat synthesis and modification. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1753-1771, 1993.

TORII, M.S., DAMASCENO, J.C., RIBEIRO, L.R., SAKAGUTI, E.S., SANTOS, G.T., MATSUSHITA, M., MATSUSHITA, N.M.I. Physical-chemical characteristics and fatty acids composition in dairy goat milk in response to roughage diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 903-909, 2004.

CAPÍTULO 1

RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NO LEITE

RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NO LEITE

Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA* Helena Teixeira GODOY**

*Fundação Ezequiel Dias / Instituto Octávio Magalhães / Divisão de Vigilância Sanitária / Serviço de Química - Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira – 30510-010, Belo Horizonte-MG – Brasil.

**Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – 13083-970, Campinas-SP – Brasil.

RESUMO: A presença de resíduos de antibióticos no leite resulta da aplicação de diferentes substâncias antimicrobianas no gado leiteiro, para o tratamento de infecções e uso profilático na prevenção de doenças, antes ou após exposição, e como aditivos adicionados à ração para promover o crescimento do animal. A monitorização desses resíduos é de extrema importância sob o ponto de vista de saúde pública, em primeiro lugar, porque pode gerar um aumento da resistência bacteriana e também por existir a possibilidade do desenvolvimento de reações tóxicas ou alérgicas em indivíduos susceptíveis. Sob o ponto de vista da indústria de laticínios, o controle de resíduos de antibióticos prende-se, além dos aspectos anteriores, ao fator da qualidade, devido à possibilidade de inibição das culturas lácteas utilizadas no fabrico de produtos fermentados, como o iogurte, leites fermentados, manteiga e queijo, levando à rejeição do leite e de seus produtos lácteos. Assim sendo, com base no conceito de Segurança Alimentar, faz-se necessária uma abordagem global e integrada, ou seja, ao longo da cadeia alimentar do leite, que indubitavelmente se baseia no estabelecimento de metodologias de verificação e de confirmação de resíduos de antibióticos, visando conhecer o potencial de exposição da população a essas substâncias. Neste trabalho, apresenta-se uma revisão sobre resíduos de antibióticos em leite, o efeito no processamento dos produtos lácteos, bem como os métodos analíticos utilizados em sua verificação.

Palavras-chave: antibióticos, leite; resíduos de antibióticos, detecção.

ABSTRACT: The presence of antibiotic residues in milk resulting from the application of various antimicrobial substances in dairy cattle for the treatment of infections and prophylactic use in prevention of disease, before or after exposure, and added to feed additives to promote growth of the animal. Their monitoring concerns to the level of public health in the first place because it can generate an increase in bacterial resistance, and secondly because there is the possibility of developing toxic or allergic reactions in susceptible individuals. In the dairy industry level, control of antibiotic residues is concerned besides the previous aspects of the quality factor due to the possibility of inhibition of lactic cultures used in the manufacture of fermented products, such as yogurt, fermented milk, butter and cheese leading the rejection of its milk and dairy products. Therefore, based on the concept of food security it is necessary a comprehensive and integrated approach, along the food chain of milk which is undoubtedly based on the establishment of methodologies for verification and confirmation of residues of antibiotic to know the potential exposure of people to harmful residues. This work presents a review of antibiotic residues in milk, as well as its effect on the processing of dairy products and the analytical methods used in the inspection.

Keywords: antibiotics, milk, antibiotic residues, detection.

1. INTRODUÇÃO

O uso de antimicrobianos no tratamento de doenças é muito antigo, visto que os processos fermentativos transcendem o início da era Cristã confundindo-se com a própria história da humanidade. Basta dizer que, há 2500 anos, os chineses usavam a casca de soja em furúnculos e em outras infecções similares. Entretanto, não eram conhecidos os agentes causadores das fermentações, que somente no século XVII foram descritos pelo pesquisador Antom Van Leeuwenhock como seres minúsculos e invisíveis a olho nu. Coube a Louis Pasteur, em 1876, provar que o processo de fermentação era devido à ação de microrganismos (ANTIBIÓTICOS, 2000).

Entre 1880 e 1910, surgiu a fermentação industrial (ácido láctico, etanol e

vinagre) e entre 1910 e 1940, a síntese de glicerol, acetona e ácido cítrico. Entretanto, o grande marco histórico na fermentação industrial foi a produção de antibióticos, a partir de 1928, com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming. Em 1935, Gerhard Domagk, pesquisador das indústrias I. G. Farben, descobriu as sulfas, ganhando o prêmio Nobel de Química em 1939. Na década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, os antibióticos passaram a integrar os processos industriais fermentativos, principalmente nos Estados Unidos, baseando-se inicialmente na síntese da penicilina. Em 1941, a penicilina foi utilizada na medicina humana. Posteriormente, Selmann Waksman, em 1945, descobriu a estreptomicina (GREENWOOD, 1997).

Os antimicrobianos são compostos que, em baixas concentrações, reduzem ou inibem o crescimento microbiano. Nesta classe incluem-se os antibióticos e os quimioterápicos. Os antibióticos são substâncias produzidas naturalmente por fungos, leveduras ou outros microrganismos e os quimioterápicos são substâncias químicas produzidas por síntese (MOREIRA, 2004). Os termos antibióticos e quimioterápicos são, atualmente, utilizados como sinônimos, ambos comportam-se como moléculas químicas que interferem em alguma via metabólica de um microrganismo ou célula-alvo.

Os antimicrobianos são importantes fármacos usados na medicina humana e veterinária. Na medicina veterinária, são utilizados no tratamento terapêutico de infecções, no profilático para a prevenção de doenças antes ou após exposição e como aditivos adicionados à ração para promover o crescimento do animal. São amplamente empregados em todas as fases de produção, ou ciclo de vida dos animais, principalmente nas infecções da glândula mamária (mastite) e em doenças de trato respiratório (BUZALSKI & REYBROECK, 1997).

Os antibióticos, segundo sua ação, podem ser classificados como bactericidas e/ou bacteriotásticos. Os bactericidas são capazes de provocar a morte do agente infeccioso, independentemente do estado imunológico do organismo e, por isso, são indicados com mais frequência. Os bacteriostáticos não eliminam o agente etiológico, apenas inibem, não permitindo a evolução do estado infeccioso. A eliminação do microrganismo depende da competência da defesa do organismo doente, devendo,

portanto, estar o animal em condições imunológicas perfeitas (FERREIRA & PESSOA, 1988; PAIVA-NETTO, 1989).

A toxicidade seletiva depende, em geral, da inibição de processos bioquímicos que são essenciais ao parasita, mas não ao hospedeiro (SPINOSA et al., 1999). Embora o mecanismo de ação de muitos antimicrobianos ainda não esteja bem esclarecido, podem-se citar alguns, como a inibição da síntese da parede celular (bacitracina, cefalosporinas, penicilinas, vancomicina); a inibição da síntese de ácido nucleico (quinolonas, pirimetamina, rifampicina, sulfonamidas, trimetoprima); a inibição da síntese de proteína, isto é, a inibição da tradução e transcrição do material genético (aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos eritromicinas, cloranfenicol, lincomicinas); e a alteração da permeabilidade da membrana celular ou do transporte ativo através da membrana celular (anfotericina B, azóis, polienos, polimixinas).

O Decreto nº 986 (BRASIL, 1969) define os contaminantes presentes nos gêneros alimentícios como:

“... qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada a um gênero alimentício, mas nele esteja presente como resíduo de produção (incluindo os tratamentos aplicados às culturas e ao gado e na prática da medicina veterinária), fabrico, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, embalagem, transporte ou armazenagem do referido alimento ou em resultado de contaminação ambiental.”

Os contaminantes podem ser classificados como substâncias naturais (toxinas) ou sintéticas (resíduos de pesticidas e/ou antibióticos ou os originários de materiais de embalagem). Dentre os antibióticos, têm-se os β -lactâmicos, que constituem as penicilinas e as cefalosporinas, as sulfas, as tetraciclina, os anfenicóis, as quinolonas, os derivados de nitrofuranos, os aminoglicosídeos, as polimixinas, a bacitracina, a vancomicina, o cloranfenicol e análogos e os macrolídeos, entre outros.

O leite ao sair do úbere, normalmente, já contém resíduos de antibióticos com ação bacteriostática conhecida. A quantidade de resíduos no leite varia de animal

para animal, sendo que o colostro e o leite oriundos de vacas com infecção, principalmente a mastite, apresentam concentrações mais elevadas (CARLSSON & BJORCK, 1987). O aquecimento do leite cru a 80°C, por 10 minutos, foi recomendado por LAMB & COOK (1982) e VERMUT et al. (1993) para promover a destruição dos resíduos antibióticos que podem estar presentes nele. Entretanto, MORETAIN & BOISSEAU (1993) constataram o mesmo resultado fazendo o aquecimento por apenas 5 minutos.

Os inibidores bacterianos naturais são denominados resíduos ou contaminantes indiretos quando as substâncias que lhes dão origem são aplicadas diretamente no organismo produtor do alimento (vegetal ou animal) e não diretamente no alimento, com exceção dos componentes de embalagens que migram diretamente para o alimento; ou quando compostos com finalidades definidas não podem ser administrados às fontes produtoras do alimento, o que às vezes não é respeitado. Ainda são considerados naturais aqueles de uso permitido, cuja presença ou de seus produtos de biotransformação nos alimentos, poderão ser minimizados, desde que aplicados segundo as boas práticas de produção e conservação do alimento.

JACKMAN et al. (1990) observaram que os resíduos de β -lactâmicos eram os mais comumente encontrados no leite, independente da forma de administração (injetável ou incorporado na água ou na ração em doses altas para o tratamento de infecções; ou em doses intermediárias para a prevenção de doenças, ou ainda em doses baixas para aumentar a velocidade de crescimento dos animais)

Em 1996, foi estimado um consumo de medicamentos veterinários de 27000 toneladas, tendo o seu apogeu entre 1997 a 2000. Nas **Tabelas 1 e 2**, mostram-se o faturamento anual do mercado veterinário no período de 1997-2004 e o percentual de utilização por espécie no Brasil, respectivamente (SINDAN, 2004).

Cerca de 50% dos medicamentos veterinários são consumidos na forma de prescrição, 25% como aditivos promotores de crescimento e os 25% restantes pela indústria avícola. Nos EUA são utilizados cerca de 10.000 kg de estreptomicina em culturas de macieira (CANA-BRAVA et al., 2002).

Tabela 1 - Faturamento anual do Setor/Mercado veterinário.

Ano	US\$
1997	856.767.453
1998	861.696.894
1999	674.328.679
2000	771.479.436
2002	593.331.259
2003	614.117.829

Fonte: SINDAN (2004)

Tabela 2 - Mercado veterinário por espécie.

Espécie	%
Bovinos	55,6
Aves	21,70
Pets	9,30
Suínos	7,80
Eqüinos	2,60
Ovino e Caprinos	3,00

Fonte: SINDAN (2004)

Segundo MITCHELL et al. (1998), aproximadamente 42% dos produtos farmacêuticos veterinários são usados no mundo inteiro como aditivos, 19% no tratamento de infecções, 13% como antiparasitários, 11% como biológicos e 15% representam outras funções farmacológicas.

Na **Tabela 3** estão apresentados os percentuais das classes terapêuticas de medicamentos mais empregados no mercado veterinário do Brasil.

Tabela 3 - Classe terapêutica do mercado veterinário no Brasil.

Classe terapêutica	Percentual
Biológico	31,5
Antimicrobianos	17,3
Endectocidas	12,0
Ectoparasitas	13,5
Anticoccidianos	6,8
Promotores de Crescimento	3,5
Vitamínicos/Tônicos Fortificantes	3,4
Endoparasitocidas/Vermífugos	4,0
Desinfetantes/Dermatológicos/Outros	2,6/0,6/2,8

Fonte: SINDAN (2004).

BISHOP et al. (1985) relataram que os antibióticos utilizados nas diferentes vias de administração podem ser eliminados pelo leite e causar reações alérgicas, afetar culturas lácteas ou criar um ambiente favorável para a seleção de bactérias resistentes.

Nos Estados Unidos, aproximadamente 12% do leite consumido apresentou contaminação com antibiótico da classe β -lactâmicos, enquanto 75% do leite consumido no norte da Alemanha continham níveis detectáveis para tetraciclina e outros antibióticos (JACKMAN et al., 1990). Conforme observado por FAGUNDES (1980), em Belo Horizonte, houve a prevalência de 5,49% de antibióticos em 183 amostras de leite tipo "B" e 1,25% em 80 amostras de leite tipo "C" comercializadas. Posteriormente, ainda em Belo Horizonte, SILVA & SENA (1984) avaliaram a presença de resíduos de antibiótico em leite pasteurizado no período de abril de 1982 a 1983 e constataram a prevalência de 4,16% em 96 amostras de leite tipo "B".

O uso de antibióticos na produção leiteira e os erros com o período de descarte são as causas mais comuns do aparecimento de resíduos de antimicrobianos no produto. De acordo com GORNI & CABRINI (2003), os monitoramentos realizados em diversos países mostram que o nível de contaminação do leite bovino por resíduos de antibióticos, em níveis de tanque, está em torno de 2% a 5%. Entretanto, essa faixa pode não estar refletindo a realidade, porque os métodos de detecção rápida, ou seja, de triagem, podem apresentar resultados positivos abaixo dos limites estabelecidos pela legislação do país ou gerar resultados falso-negativos, se não forem empregados de forma correta.

2. β - LACTÂMICOS

Antibióticos denominados β -lactâmico são por possuir em sua molécula um anel beta-lactâmico. Segundo CHAMBERS & SANDE (1996) existem 4 sub-classes de β -lactâmicos usados no tratamento de infecções: (1) os cefalosporínicos de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª gerações, sendo entre os β -lactâmicos os que maior número de moléculas semi-sintéticas disponibilizam para tratamento, inclusive de infecções hospitalares e

também comunitárias; (2) os penicilínicos, que são derivados semi-sintéticos da penicilina, como penicilina V, penicilina G, amoxilina, ampicilina; oxacilina, cloxacilina dicloxacilina etc; (3) os carbapenêmicos, como o imipenem, meropenem, ertapenem e panipenem; e (4) o clavulanato, com mínimo espectro de atividade, mas usado como inativador de β -lactamase, enzima produzida pela bactéria para resistir à ação dos antibióticos β -lactâmicos.

2.1. Cefalosporinas

As cefalosporinas foram isoladas, em 1948, por G. Brotzu, em Cagliari/Itália, do fungo *Cephalosporium acremonium*, cujo extrato mostrava ação bactericida contra germes Gram-positivos e negativos. Anos mais tarde, H. Florey descobriu vários compostos produzidos por *C. acremonium* com atividade antimicrobiana, como as cefalosporinas P, N e C. Em 1963, foi iniciada sua aplicação clínica, com a síntese de cefalosporinas semi-sintéticas (THOMPSON et al., 1984).

Os antibióticos cefoperazone, ceftiofur, cefapirina, cefalotim, cefazolin e cefotaxim pertencem à família das cefalosporinas. Reunem características que os destacam, como a alta atividade, o amplo espectro de ação, a fácil administração e a baixa toxicidade. Apresentam em sua estrutura química um anel β -lactâmico ligado a um anel de di-hidrotiazida de 6 membros, constituindo assim o núcleo *cefem* do qual derivam todas as cefalosporinas. Diferenciam-se das penicilinas, que também possuem um anel β -lactâmico, por este anel estar ligado a outro anel tiazolidínico de cinco membros (**Figuras 1 e 2**). Essa diferença é o que caracteriza o fato das cefalosporinas apresentarem vantagens em relação às penicilinas. As cefalosporinas são intrinsicamente mais resistente à ação de muitas enzimas, o que explica o seu amplo espectro de ação. Aliado a este fato, o núcleo das cefalosporinas apresenta um grupo carboxílico no C₄ e uma cadeia lateral β -acilâmica no C₇ (-R1), e ainda permite a adição de distintos substituintes em C₃ (-R2), enquanto, no núcleo da penicilina, as variações ocorrem somente na posição C₆ (-R1), (THOMPSON et al., 1984; MELLA et al., 2001).



Figura 1: Estrutura química das cefalosporinas

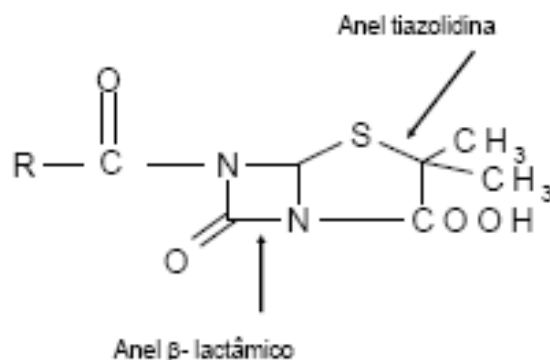


Figura 2: Estrutura química das penicilinas

Em termos microbiológicos, as cefalosporinas atuam como bactericidas. A ação bactericida é devida à habilidade do anel β -lactâmico ligar-se à enzima produzida pela bactéria e que exerce importante propriedade na síntese da parede celular do microorganismo (THOMPSON et al., 1984). O aumento da resistência do anel β -lactâmico às β -lactamases é obtido pela substituição no -R3 da estrutura primária das cefalosporinas, enquanto as modificações na posição -R1, grupamento acil, acarreta mudanças na atividade antibacteriana. As substituições na posição -R2 levam às modificações no comportamento farmacocinético da molécula (CAPRILE, 1998).

As cefalosporinas são classificadas em “gerações”, tendo como base o

espectro de atividades para microorganismos Gram-positivos e negativos (BRYSKIER et al., 1990). Em termos gerais, à medida que evoluíram, as gerações ganharam atividades frente aos microorganismos gram-negativos enquanto as dos gram-positivos foram reduzidas. Elas também melhoraram seu comportamento em relação ao principal fator de resistência, ou seja, às β -lactamases. Frente a essas enzimas, as de 3ª e 4ª geração são mais estáveis do que as das 1ª e 2ª. As de 1ª geração foram aprovadas para uso clínico, sendo mais ativas frente à maioria dos microorganismos Gram-positivos aeróbios, incluindo o *Staphylococcus aureus*. As da 2ª geração apresentam menor atividade frente ao *Staphylococcus spp.*, e são mais ativas frente a alguns microorganismos Gram-negativos. Sua atividade frente à maioria dos anaeróbios é pequena (BRYSKIER, et al. 1990). Segundo SPINOSA et al. (1999), as cefalosporinas de 3ª geração são empregadas na prática médica desde 1980, sendo altamente ativas contra germes Gram-negativos. As cefalosporinas de 4ª geração apresentam um amplo espectro frente aos microorganismos Gram-negativos e positivos, porém baixa atividade para os anaeróbios. Entretanto, nenhuma cefalosporina é ativa frente à *Enterococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella*, *Mycoplasma* y *Chlamydia*.

Quanto à farmacocinética, as cefalosporinas apresentam diferenças conforme suas formas distintas. Na administração oral, são absorvidas rapidamente no trato gastrointestinal, no entanto esta absorção pode ser influenciada quando associada a alimentos e antiácidos, ocorrendo redução. A maioria tem vida média curta e são excretadas por via urinária ou por via hepática. O mecanismo de ação das cefalosporinas é similar à dos outros antibióticos β -lactâmicos (MELLA et al., 2001). Elas exercem efeito bactericida interferindo na síntese da parede celular, inativando as enzimas autolíticas.

A resistência bacteriana ao antibiótico deste grupo pode ocorrer pela inativação enzimática do medicamento, pela incapacidade do antibiótico alcançar o sítio ativo ou ainda pelas alterações na proteína fixadora do β -lactâmico. Para as cefalosporinas, a hidrólise enzimática é o mecanismo de resistência bacteriana mais importante.

O cefoperazone está incluído no grupo das cefalosporinas semisintéticas da terceira geração, apresentando um amplo espectro de ação contra microorganismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos e bactéria patogênica Gram-negativa e in vitro (**Figura 3**).

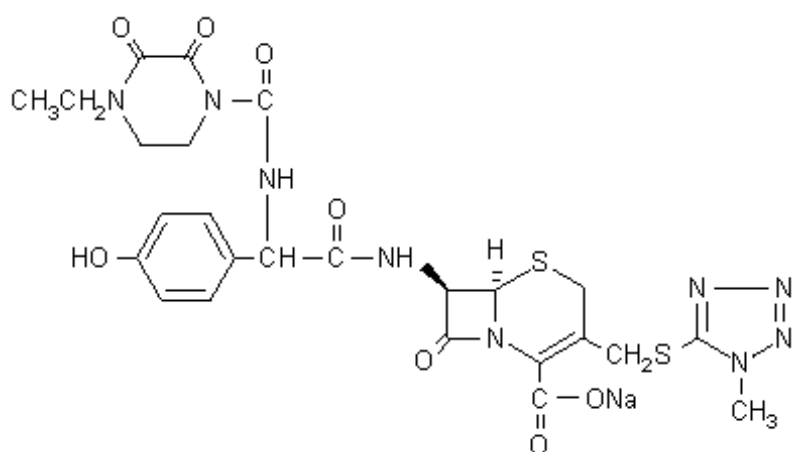


Figura 3: Estrutura química do cefoperazone

Farmacologicamente, seus efeitos são comparáveis às demais cefalosporinas, porém, necessitam de uma dosagem muito alta para obtê-los. Sua DL50 é maior que 12 g/kg-pc (peso corpóreo) e a DL50 parenteral nessas espécies varia aproximadamente de 4 a 10 g/kg-pc. Experimentos realizados em ratos utilizando doses subcutâneas de 125 a 100 mg/kg-pc e doses orais de 0, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg-pc não acarretaram efeitos teratogênicos. Os efeitos de mutagenicidade e de carcinogenicidade do cefoperazone e de seus metabólitos não foram observados em teste de mutação de gene em *E. coli* e *Salmonella typhimurium* e nos estudos de toxicidade realizados em ratos e camundongos. Sua ingestão diária aceitável (IDA) foi estabelecida em 0,75 mg/kg-pc (EMEA, 2001).

Concentrações de 0,03 a 0,68 µg/mL de cefoperazone foram determinadas por método enzimático no soro e na urina, após 8 horas de administração intramamária de 250 mg do antibiótico em vacas em lactação. No entanto, o cefoperazone é eliminado primariamente por via biliar (IARC, 1990; EMEA, 2001).

O ceftiofur (**Figura 4**) consiste de um antibiótico da classe das cefalosporinas

de 3ª geração, amplamente utilizado como medicamento veterinário em vacas, inclusive aquelas em lactação, no tratamento de doenças respiratórias e mastite. É lentamente absorvido após administração oral e rapidamente após a intramuscular.

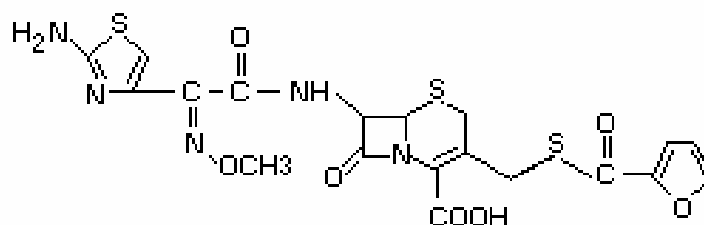


Figura 4: Estrutura química do ceftiofur.

Estudos com ^{14}C -ceftiofur em vacas e em ratos mostraram a clivagem da ligação tioéster produzindo os metabólitos desfuroilceftiofur e ácido furânico. O principal metabólito encontrado no gado leiteiro é o desfuroilceftiofur e o desfuorilceftiofur-cisteína disulfeto. Estudos de toxicidade em ratos não evidenciaram efeito carcinogênico e teratogênico, porém os mutagênicos (JECFA, 1999). Sua DL50 oral em ratos foi de 7800 mg/kg-pc, enquanto que a DL50 parenteral foi de 1250 mg/kg-pc. O valor estabelecido de IDA é de 0 a 50 $\mu\text{g/kg-pc}$ (EMEA, 2002).

A cefapirina é uma cefalosporina da 1ª geração (**Figura 5**). Estudos de toxicidade aguda mostraram que a DL50 oral em ratos foi de 14000 mg/kg-pc. A DL50 parenteral foi de 25000 e 8400 mg/k-pc após a administração intravenosa em cães e intraperitoneal em ratos, respectivamente. Os principais efeitos observados após administração foram ataxia e convulsões. Não foram encontradas evidências de efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. A cefapirina é degradada em desacetilcefapirina em todos os tecidos. A IDA estabelecida é de 2,5 $\mu\text{g/kg-pc}$ (EMEA, 2001).

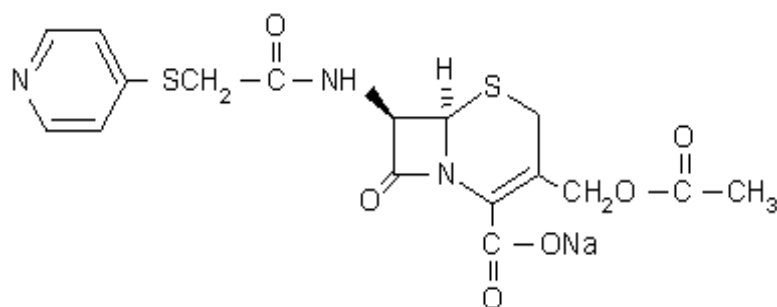


Figura 5: Estrutura química do cefapirina.

O cefalotin é um antibiótico semi-sintético pertencente à 1^a geração das cefalosporinas (**Figura 6**). Em pesquisas com ratos, mostrou uma biodisponibilidade variando entre 27 a 32 minutos após administração intramuscular de doses de 0,5, 1,0 e 2,0 g, apresentando recuperações médias de 87, 90, e 99%, respectivamente. É parcialmente biotransformado em derivado acetilado, menos ativo microbiologicamente (BRUMFITT et al., 1974).

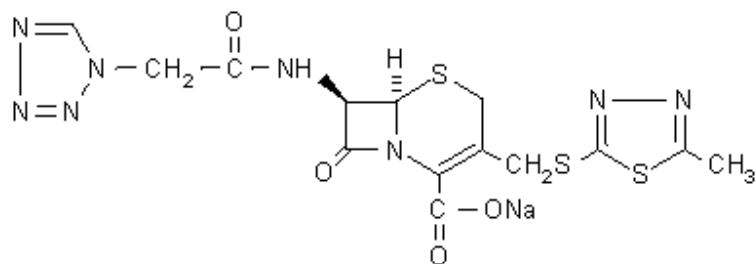


Figura 6: Estrutura química do cefalotin.

O cefazolin é uma cefalosporina de 1^a geração. Sua DL50 oral em ratos foi de 11.000 mg/kg-pc (**Figura 7**). Os efeitos de carcinogenicidade não são mencionados nos estudos realizados pela American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) e pela International Agency for Research on Cancer (IARC). Entretanto, em alguns estudos têm sido relatadas reações alérgicas intensas em pessoas sensíveis, como eritema maculopapular, eritema multiforme, urticária, síndrome de Stevens-Johnson, edema angioneurótico, bronco espasmo e anafilaxia.

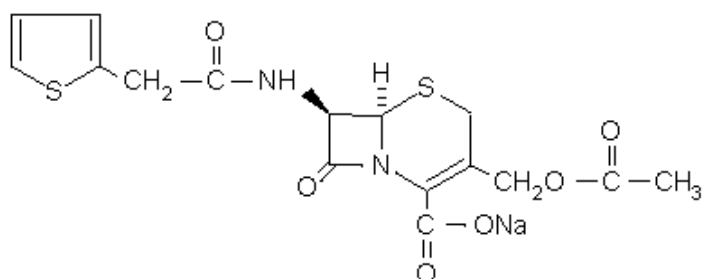


Figura 7: Estrutura química do cefazolin.

2.2. Penicilinas

As penicilinas constituem uma das mais importantes classes de antibióticos e são amplamente utilizadas no tratamento clínico de infecções causadas por diversas bactérias. A descoberta da penicilina é creditada ao Dr. Alexander Fleming que, em 1928, observou, ao estudar em laboratório variantes de estafilococos, que a cultura de um tipo de fungo, *Penicillium notatum*, produzia uma substância que inibia o crescimento bacteriano. Esta substância recebeu, em função do microorganismo que lhe deu origem, o nome de penicilina. Em virtude de dificuldades na sua produção e purificação, a penicilina só foi usada no tratamento de infecções a partir de 1941, quando o Dr. Howard W. Florey e colaboradores a produziram em quantidades suficientes para uso clínico. Os primeiros ensaios clínico-terapêuticos com o uso dessa classe de antibióticos em humanos foram conduzidos com sucesso nos EUA na década de 40, objetivando o tratamento de infecções estreptocócicas e gonocócicas.

A estrutura química básica das penicilinas é formada por um ácido 6-aminopenicilânico, um anel tiazolidina unido a um anel beta lactâmico que leva um grupo amino livre (**Figura 8**) (CHAMBERS & SANDE, 1996). Uma modificação na posição 6 da cadeia lateral do anel β -lactâmico resulta em drogas com diferentes propriedades antibacterianas e farmacológicas.

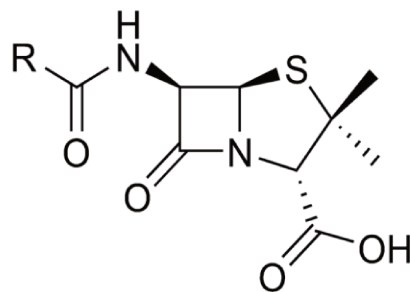


Figura 8: Estrutura química da penicilina

As penicilinas podem ser classificadas de acordo com seu espectro de atividade antimicrobiano, como segue:

- penicilina G e V: muito ativas contra cocos Gram-positivos, mas são altamente hidrolisadas pela penicilinase.
- penicilinas resistentes à penicilinase: atividade menor que as anteriores, no entanto são as indicadas em infecções causadas por *S. aureus* produtores de penicilinases. Pertencem a esse grupo a meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e floxacilina.
- penicilinas ativas contra microorganismos Gram-negativos (*Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*), mas são rapidamente hidrolisadas pela penicilinase estafilocócica. Aqui está a ampicilina, amoxicilina, hecetilina, cicladina e bacampicilina.
- penicilinas ativas contra *Pseudomonas*, *Enterobacter* e espécies de *Proteus* (carbenicilina, indanil-carbenicilina, ticarcilina e azlocilina).
- penicilinas de espectro ampliado (mezlocilina e piperacilina) que possuem atividade contra *Pseudomonas* e *Klebsiella* e outros Gram-negativos. A andinocilina (ou mecilinama) é pouco ativa em Gram-positivos, mas é indicada contra *Enterobacteriaceae*. É geralmente associada com outros β -lactâmicos com os quais age contra numerosos organismos resistentes.

A parede celular dos microorganismos contém um complexo polímero de ligação cruzada quimicamente distinto, os peptidoglicanos que são formados de

cadeias de glicano e resíduos piramínosídicos alternados de dois amino açúcares (N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico), e que apresentam ligação cruzada com peptídeos. A composição dessa ligação peptídica cruzada é típica de cada microorganismo e confere a rigidez à parede celular. A camada de peptideoglicanos das bactérias Gram-positivas é de 50 a 100 moléculas, enquanto a das Gram-negativas possui apenas uma ou duas. Todas as penicilinas e cefalosporinas são inibidoras seletivas da síntese da parede celular bacteriana, embora seja apenas uma das ações desses fármacos, é a melhor compreendida que as demais.

A etapa inicial de ação é a ligação desses fármacos às proteínas de ligação da penicilina (PBP). Diferentes PBPs podem exibir afinidades diferentes por determinado fármaco e cada um pode mediar um modo particular de ação, por exemplo, alongamento anormal da célula ou lise celular.

Peptideoglicanos são sintetizados em três etapas, sendo que a última, que culmina no término da formação da ligação cruzada, envolve uma transpeptidação por transpeptidase ligada à membrana. A ligação da penicilina (e cefalosporinas) às PBPs gera inibição desta transpeptidação influenciando na síntese da parede celular.

A etapa seguinte de ação das penicilinas envolve, provavelmente, a remoção ou inativação de um inibidor de enzimas autolíticas (hidrolases) na parede celular. Esse processo pode resultar em lise caso o meio seja isotônico. Em meio hipertônico, as bactérias podem tornar-se protoplastos ou esferoplastos recobertos apenas pela frágil membrana celular. Em geral, na menor concentração eficaz de um antibiótico, a divisão celular é inibida, mas o alongamento prossegue. Em concentrações maiores do antibiótico, o crescimento é inibido e ocorre a lise em seguida. Os β -lactâmicos inibem o crescimento, mas não causam sua lise.

Para atingir os receptores, os fármacos devem atravessar as camadas externas do envoltório celular. Nas bactérias Gram-negativas há uma membrana fosfolipídica externa que pode dificultar a passagem desses fármacos. Se esses forem capazes de passar pelas moléculas dos poros (porinas) dessa barreira, a ação sobre os receptores será facilitada. Moléculas mais hidrofílicas como ampicilina e amoxicilina poderão passar mais facilmente que a penicilina G, daí sua melhor ação

contra Gram-negativas, já que as Gram-positivas não possuem a membrana fosfolipídica. As diferenças na sensibilidade das bactérias Gram-positivas e negativas às várias penicilinas dependem, portanto, de diferenças estruturais como: quantidade de peptoglicano, presença de receptores, poros e lipídeos, natureza da ligação cruzada, atividade das enzimas autolíticas, entre outros. A ausência de toxicidade das penicilinas (e cefalosporinas) para as células dos mamíferos deve ser atribuída à ausência de uma parede celular do tipo bacteriano nesses animais. Tal fato atende ao critério de especificidade ao agente patogênico que deve ter um bom antibiótico.

As penicilinas distribuem-se amplamente no organismo após absorção, mas são rapidamente eliminadas, em especial por filtração glomerular e secreção tubular renal, de modo que sua meia vida no organismo é de curta duração (30 a 60 minutos), por conseguinte, são altas as concentrações urinárias. É também excretada no catarro e no leite, atingindo, níveis de 3-15% em relação aos do soro.

Apenas em uma pequena porcentagem de pacientes (3 a 10%) são observadas reações de hipersensibilidade com as penicilinas. As reações alérgicas geralmente aparecem de 7 a 10 dias após o início do tratamento e, geralmente, aparecem quando esses pacientes estão sendo expostos a uma segunda dose.

Não existem dados disponíveis para calcular a dose mínima requerida por via oral para induzir uma resposta imune. Há deficiência de dados sobre a imunogenicidade em humanos decorrente da ingestão de penicilina em baixas dosagens por via oral, a maior parte dos casos relatados foram causados pela administração por via parenteral, embora existam casos de reações alérgicas agudas pela ingestão de leite. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) para a benzilpenicilina e para a benzilpenicilina procaína é de 30µg/Kg de peso corpóreo. A ampicilina, a amoxicilina, a cloxacilina e a oxacilina não possuem Ingestão Diária Aceitável estabelecida pelo JECFA.

Os resíduos de penicilina também inibem as culturas de microorganismos usadas para a produção de iogurtes, queijos e outros produtos lácteos

A **Figura 9** apresenta as estruturas químicas das principais penicilinas.

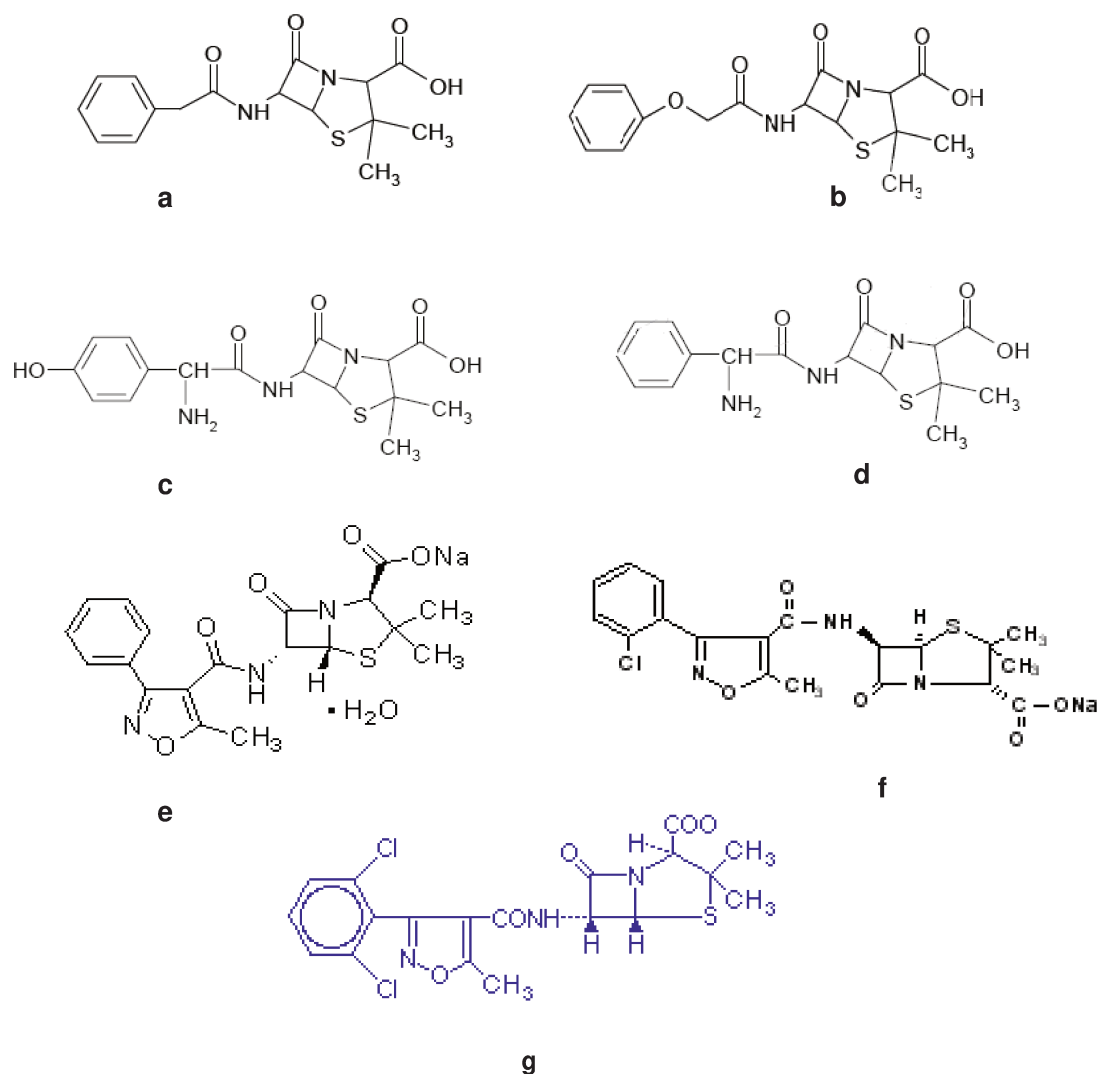


Figura 9: Estrutura química da benzilpenicilina G (a), penicilina V (b), amoxilina (c), ampicilina (d), oxacilina (e), cloxacilina (f), dicloxacilina (g).

3. ANFENICÓIS

O cloranfenicol é um antibiótico sintético da classe anfenicol que foi isolado primeiramente da cepa de *Streptomyces venezuelae*. O tianfenicol e o florfenicol são análogos ao cloranfenicol, diferindo pela presença de um grupo metilsulfônico no anel benzênico, enquanto o cloranfenicol apresenta um grupo nitroso (**Figura 10**).

O florfenicol é derivado da molécula do tianfenicol, que possui maior espectro

de ação devido à substituição do grupo hidroxila do carbono 3 por um átomo de flúor e pela substituição do grupo para-nitro por um radical metilsulfônico, diminuindo a possibilidade do aparecimento de anemia aplásica. Todos têm atividade antimicrobiana idêntica, porém o tianfenicol e o florfenicol não são capazes de desenvolver anemia aplásica. Apresentam amplo espectro de ação, atuando sobre as bactérias Gram-positivas e negativas, riquetsia, espiroquetas e micoplasma.

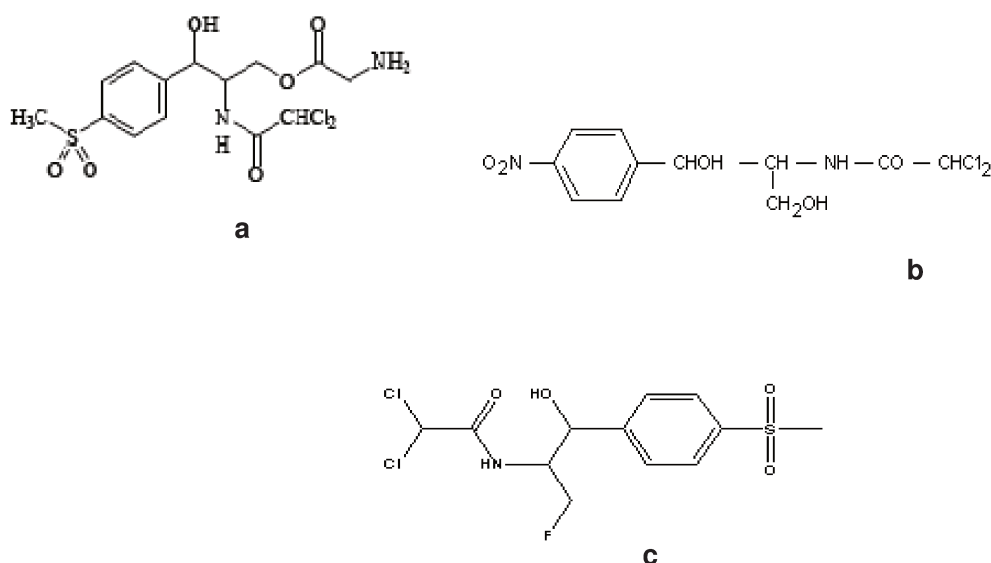


Figura 10: Estrutura química do tianfenicol (a), cloranfenicol (b) e florfenicol (c).

O cloranfenicol e seus análogos inibem a síntese protéica dos microorganismos sensíveis, ligando-se à subunidade 50S. Dessa forma, interfere na formação do peptídeo, ao bloquearem a enzima peptidiltransferase e impedirem o alongamento da cadeia polipeptídica, característica dos antibióticos bacteriostáticos (SPINOSA, et al., 1999). Seu principal efeito é sobre a medula óssea afetando, principalmente, o sistema hematopoiético de duas formas, pelo efeito tóxico relacionado à dose, que se manifesta por anemia, eucopenia ou trombocitopenia, e

pela resposta idiossincrática manifestada pela anemia aplástica, levando muitas vezes à pancitopenia fatal. Acredita-se que a anemia aplástica esteja relacionada com a estrutura química do cloranfenicol, uma vez que esse efeito não ocorre com os seus análogos. Em recém-nascidos, especialmente em prematuros, quando expostos às quantidades excessivas, pode levar à síndrome do bebê cinzento. Essa é caracterizada por um quadro de acidose metabólica, respiração irregular e rápida e fezes líquidas de coloração esverdeada nas primeiras 24 horas (JECFA, 1999).

A resistência bacteriana é mediada por plasmídeos que têm a capacidade de produzir a enzima cloranfenicol-acetiltransferase que inativa o cloranfenicol. Essa enzima impede a interação do cloranfenicol e do tianfenicol com os ribossomos bacterianos, abolindo a atividade antibacteriana. Por outro lado, a presença de um átomo de flúor na molécula do florfenicol impede a acetilação mediada pela enzima, fazendo com que cepas bacterianas resistentes ao cloranfenicol e ao tianfenicol se tornem sensíveis ao florfenicol. Resistências cruzadas também já foram observadas entre o cloranfenicol e outros antibióticos, como os macrolídios e as lincosamidas (HIRD & KNIFTON, 1986).

Em animais monogástricos, o cloranfenicol é bem absorvido no trato digestivo, mas, em ruminantes, é destruído pela flora ruminal. Cerca de 30% a 45% ligam-se às proteínas plasmáticas, distribuindo-se relativamente bem por todos os tecidos e, também, atravessa a barreira placentária (TAVARES, 1988).

O cloranfenicol é biotransformado no fígado, sendo eliminado pela urina conjugado com o ácido glicurônico ou na forma intacta, via filtração glomerular. Os metabólitos inativos são excretados principalmente por esta via e em pequena parte pela bile (IARC, 1990).

A DL50 do cloranfenicol é de 1300 a 1800 mg/kg-pc. Segundo a IARC (1990), os estudos carcinogênicos ainda não foram conclusivos, testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* evidenciaram aberrações cromossômicas em camundongos, mas não houve evidências de efeitos teratogênicos.

O cloranfenicol não está aprovado pelo FDA para uso em animais produtores de alimento, em razão de ter uma tendência em produzir anemia aplásica em determinadas pessoas susceptíveis. Na Grã-Bretanha, tem sido restringido ao uso

oftálmico e ao tratamento sistêmico de grandes e pequenos animais, uma vez que estudos laboratoriais e clínicos mostraram não existir outro antibiótico que pudesse ser efetivo. Na Austrália, nenhuma quantidade de resíduos de cloranfenicol é permitida no alimento, sendo, então, proibido qualquer tipo de administração nos animais de produção. Já a União Européia permite a utilização de tianfenicol em bovinos e seu limite máximo de resíduo no leite é de 50 $\mu\text{g/kg-pc}$ (CEE, 1990). Recentemente, o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1998) proibiu a utilização do cloranfenicol em animais destinados à produção de alimentos no Brasil.

4. LIMITES MÁXIMOS DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Existem muitas organizações internacionais e nacionais envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle da utilização de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos. Esses mecanismos incluem controle da distribuição de uso, determinação do nível seguro de resíduos e da metodologia empregada para detecção e quantificação. Internacionalmente tem-se a Comissão do Codex Alimentarius que executa os programas conjuntos coordenados pelas Organizações para Agricultura e Alimentação (FAO) e Mundial de Saúde (OMS), criado em 1963, cuja diretriz é a proteção da saúde do consumidor e a promoção do comércio internacional de alimentos.

O Comitê sobre Resíduos de Drogas Veterinárias em Alimentos da Comissão do Codex Alimentarius, estabelecido em 1987, é o responsável pela determinação dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) para as substâncias veterinárias nos alimentos de origem animal, além de fornecer informações sobre barreiras técnicas relacionadas ao comércio de produtos veterinários. Os LMRs, estabelecidos pelo Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food (1993), baseiam-se em dados científicos da Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e FAO/OMS.

Outros órgãos internacionais incluem a European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA), o Office Internacional des Epizooties (OIE) e o Consultation Mondiale de Industrie de La Santé Animale (COMISA). Além desses,

alguns países têm grupos de especialistas envolvidos, como o Food and Drugs Administration (FDA), nos Estados Unidos, o Bureau of Veterinary Drugs, no Canadá, e o Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, na Inglaterra.

Na União Européia, a utilização de medicamentos veterinários foi regulamentada através do Regulamento 2377/90 (CEE, 1990), que estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, sendo composto pelo Anexo I que inclui substâncias em relação às quais tenham sido estabelecidos LMR final; Anexo II que inclui substâncias em relação às quais não se considera necessário, para a proteção da saúde pública, estabelecer LMR valores e Anexo III que inclui substâncias com teores máximos de resíduos provisórios. Esses são estabelecidos por um período de tempo definido, quando nem todos os requisitos para o estabelecimento de um LMR ainda não foram concluídos. É ainda composto pelo anexo IV que inclui substâncias para as quais não pôde ser estabelecida LMR, porque resíduos dessas substâncias foram consideradas nocivas à saúde do consumidor, sendo, portanto, proibidas.

A Diretiva 96/23/CE (CE, 1996) regula o controle de resíduos de compostos farmacologicamente ativos, ou seja, contaminantes ambientais, corantes, elementos químicos, e outros, em produtos de origem animal. Essa divide todos os resíduos em: Grupo A, que inclui as substâncias proibidas no anexo IV (CEE, 1990), e Grupo B compostos, que incluem todos os medicamentos veterinários registrados em conformidade com os anexos I e III (CEE, 1990). A Diretiva 96/23/CE também estabelece o controle de animais produtores de alimentos, bem como os seus produtos primários como carne, leite, ovos e mel. Isso significa que as amostras são colhidas a partir da vida animal na produção de explorações agrícolas. Paralelamente estabelece os Programas de Monitoramentos de Resíduos, visando acompanhamento junto com as vigilâncias, bem como das carcaças nos matadouros. A Diretiva determina que as análises sejam realizadas em laboratórios acreditados. Assim, uma extensa rede de laboratórios de resíduos analíticos foi criada com a finalidade de inspecionar os resíduos. Esse sistema hierárquico compreende, em nível de menor complexidade, cerca de quarenta Laboratórios de Campos de

Referência (LNR) e, em nível de maior complexidade, quatro Laboratórios Comunitários de Referência (LCR) que estão localizados na Alemanha, França, Itália e Holanda. Cada laboratório é responsável pela análise de um grupo de substâncias.

As orientações técnicas e os critérios de desempenho para controle de resíduos foram descritos na Diretiva 657/2002 (EC, 2002). Na União Européia, não existe a obrigação de utilizar métodos normalizados para controle dos resíduos de animais produtores de alimentos, em vez disso, estabeleceram-se critérios de desempenhos (EC, 2002) que devem ser cumpridos pelos métodos utilizados. Uma grande vantagem desta abordagem é o elevado grau de flexibilidade, visto a pronta adaptação dos métodos analíticos à evolução técnica, além de poder resolver rapidamente os novos problemas, no que se refere à análise de analito em matrizes que não tenham ainda métodos estabelecidos. Entre os exemplos recentes, tem-se a contaminação do mel com cloranfenicol e acetato de medroxiprogesterona em melaço (GOWIK, 2003). Além disso, a Diretiva 657/2002 (EC, 2002) leva em conta as recentes evoluções técnicas, como a utilização da cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM) para a análise de resíduo. Na **Tabela 4**, estão registrados os LMRs dos antibióticos a serem pesquisados, segundo os diferentes órgãos.

Até recentemente, o grupo A, substâncias chamadas "tolerância zero", teve níveis de resíduos estabelecidos, causando certa ambiguidade. Assim, e com a finalidade de uma harmonização com a União Européia, estabeleceu-se que os "Estados-Membros" deverão garantir que os métodos analíticos utilizados para a detecção destas substâncias cumpram os limites mínimos de desempenho requeridos (LMDR) estabelecidos no **Anexo II** relativamente às matrizes referidas", e que para o cloranfenicol em leite foi de 0,3 µg/L (EC, 2003).

Os limites para resíduos foram estabelecidos na forma de tolerância ou limite máximo de resíduos (LMR), que é definido como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de medicamentos veterinários contida no alimento, expressa em µg/kg.

Tabela 4: Limite máximo permitido de resíduos de antibióticos no leite, de acordo com a União Européia (EU) e Mercosul.

Grupo de Antimicrobianos	Substância Farmacologicamente Ativa	RLMR (µg/L)	Valor de Referência	
β-Lactâmicos	penicilinas	Benzilpenicilina procaína	4	Mercosul
		Ampicilina	4	Mercosul
		Amoxiciclina	4	Mercosul
		Cloxacilina	30	UE**
		Oxacilina	30	UE**
		Dicloxacilina	30	UE**
	cefalosporinas	Ceftiofur	100	Mercosul
		Cefapirina	60	UE**
		Cefazolin	50	UE**
		Cefoperazone	50	UE**
Anfenicóis	Cloranfenicol	0	Mercosul	
	Florfenicol	ND*	-	
	Tianfenicol	50	UE**	

Fontes: CODEX ALIMENTARIUS (2008), MERCOSUL (2000); ND* - não definido

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 42 (BRASIL, 1999), o estabelecimento dos LMRs é de competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos, utilizam-se os internalizados no Mercosul, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os constantes nas Diretivas da União Européia, ou ainda, os usados pelo FDA.

5. CARACTERÍSTICAS E EFEITOS DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO PROCESSAMENTO DO LEITE

A maioria dos antibióticos usados pela medicina veterinária não são destruídos por processos normais de estocagem e cozimento (LLOYD et al., 1987). A penicilina pode ser considerada um antibiótico resistente ao calor, pois a pasteurização normal inativa apenas 8% deste produto no leite (FAGUNDES & MOLIN, 1998 BRITO et al., 2000).

LEDERER (1991) constatou que, após a injeção de diversos tipos de penicilina no gado leiteiro, os resíduos dos antibióticos foram observados durante 30 a 78 horas após a ordenha, recomendando não ser conveniente consumir o leite

ordenhado nas 96 horas subsequentes à administração do antibiótico. A presença da penicilina G ainda foi detectada após 10 dias, assim a mesma não poderá ser administrada em vacas em lactação.

Para MITCHELL et al. (1998), teoricamente, todas as vias de administração levam ao aparecimento de resíduos nos alimentos de origem animal. Estes resíduos desempenham papel importante, pois uma substância tóxica pode ser transferida do organismo materno para o do lactente através do leite. Assim, vários compostos presentes nos organismos dos animais podem ser transferidos para a população através do leite e dos produtos lácteos.

Os antibióticos surgem no leite por difusão, que é facilitada pela diferença de pH existente entre o plasma e o leite, elevando ainda mais a concentração no leite. Segundo COSTA (1996), as diferenças existentes na secreção de resíduos de antibióticos no leite podem ser atribuídas às variações entre espécies, ao tipo de formulação do antibiótico aplicado, à quantidade de leite produzido e ao período de carência.

Na indústria de laticínios, a presença de resíduos de antibióticos acarreta perdas econômicas bastante drásticas, porque pode induzir a inibição dos processos fermentativos de origem bacteriana, base da fabricação de diversos produtos lácteos (LAMB & COOK, 1982), além de alterar suas características organolépticas.

Para FAGUNDES & MOLIN (1998), os queijos originários do leite contendo resíduos de antibióticos não deessoram bem e os fermentos são inibidos, levando à proliferação de germes gasógenos. Na produção do iogurte, sua presença interfere muito, porque as culturas utilizadas são sensíveis a alguma classe de antibióticos. Portanto, podem provocar o desequilíbrio microbiano, favorecendo a proteólise e a separação do soro no produto, conferindo um aspecto desagradável. Para os produtores de manteiga, a presença de resíduos de antibióticos no leite acarreta a supressão da fermentação acidificante dos cremes, com redução na produção de diacetil, ocasionando maior dificuldade de bateção e, também, modificando o sabor (EECKHOUTTE, 1978).

Amostras de iogurte foram fortificadas com benzilpenicilina, cloxacilina, oxacilina, dicloxacilina, ampicilina ou nafcilina em concentrações iguais e acima do

LMR e concluiu-se que a coagulação foi influenciada negativamente pelo aumento da concentração dos resíduos de penicilinas. Por outro lado, os parâmetros do processo como o tempo e a temperatura de fermentação levaram à redução da concentração da penicilina, visto que os principais produtos de degradação da penicilina G, identificados por cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas (LC-MS/MS), foram os ácidos penicílico e penicilóico (GRUNWALD & PETZ, 2003; BOATO et al., 1998).

MARTINS et al. (2008) estudaram a presença de resíduo do antibiótico cloxacilina em 200 amostras de leite, após sua adimistração intramamária no gado leiteiro, no intervalo de 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados encontrados mostraram que o leite de animais tratados com o antibiótico cloxacilina, continham resíduos deste antibiótico até 72 horas após o fim do tratamento.

Amostras de leite (n=63) analisadas na Alemanha, por ensaios imunoenzimáticos, mostraram a presença de β -lactâmicos em 95% das amostras (KRESS et al. 2007). NAVRÁTILOVÁ (2008), em sua pesquisa, mostrou que os métodos microbiológicos foram fáceis de executar, pois atenderam um amplo espectro de resíduo; entretanto, não apresentam sensibilidade compatível com os níveis de LMR, como nos ensaios imunoenzimáticos.

6. MÉTODOS DE ANÁLISES PARA RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Os métodos para detectar resíduos de antibióticos no leite foram desenvolvidos a partir de 1941. Entre 1944 e 1945, foi desenvolvido o método de ensaio em disco de papel-filtro, e a partir de 1950, o ensaio em disco foi realizado com o *Bacillus subtilis* para detectar resíduos de antibióticos no leite. Entre as décadas de 70 e 80, os ensaios em disco foram realizados com *B. stearothermophilus* e começaram a serem aplicadas as técnicas de radioimunoensaios e enzimáticas, para detectar a presença dos antibióticos β -lactâmicos e outros, como tetraciclinas, estreptomicina, eritromicina, novobiocina, cloranfenicol e sulfonamidas. No final dos anos 80, foram desenvolvidos os ensaios

imunológicos baseados em anticorpos monoclonais, os quais foram introduzidos por BISHOP et al. (1985) e SETFORD et al. (1999).

Os ensaios microbiológicos baseiam-se na inibição do crescimento de várias cepas antimicrobianas (*B. stearothermophilus*, *S. salivarius* spp. *thermophilus*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *Micrococcus luteus*). As concentrações de antibióticos detectadas nas várias análises antimicrobianas variam entre os diferentes ensaios devido a sua sensibilidade aos inibidores naturais do leite de vaca e/ou presentes no leite de animais com mastite, podendo levar a um resultado de teste falso-positivo (HALBERT et al., 1996; ZENG et al., 1996).

HARIK-KHAN & MOATS (1995) demonstraram a detecção de resíduos de β -lactâmicos em leite utilizando “Kit Delvotest” e concluíram que aqueles com detecção positiva apresentaram alterações em seu sabor. ALBUQUERQUE et al. (1996) utilizaram o método clássico da AOAC, com discos de papel de filtro e cultura teste de *B. steroothermophilus*, para avaliação de leites comercializados em Fortaleza. Os resultados sugeriram uma sensibilidade de detecção do método de 0,0005 UI/mL e que os leites apresentavam altos índices de antibiótico da classe dos β -lactâmicos.

BORGES et al. (2000) avaliaram a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite pasteurizado comercializado no estado de Goiás, no período de 1997 a 1998, utilizando método microbiológico. De acordo com os resultados obtidos, 53 amostras (9,95%) das 533 analisadas continham resíduos de antimicrobianos. Dentre as marcas comerciais, das 98 submetidas a exame, 32,65% foram positivas para antimicrobianos. Por sua vez, NASCIMENTO et al. (2001) demonstraram que, de 96 amostras analisadas de leites pasteurizados de seis diferentes marcas adquiridas em Piracicaba, 50% apresentaram resíduos de antibióticos, não havendo diferença significativa ($p < 0,01$) entre elas. O percentual de resíduos de penicilina nas amostras foi de 72,5%.

Em ensaios com receptores microbianos ligantes, foram empregados dois tipos de células bacterianas contendo um sítio receptor natural para o antibiótico dentro ou sobre a célula e/ou coberto com um anticorpo e um ^{14}C ou ^3H do antibiótico (CHAM & CHI, 1982, 1988; CARLSSON & BJORCK, 1991; ANDERSON et al., 1992;

CHEN & CHANG, 1994; SALTER et al., 2001). Este KIT foi utilizado para detecção rápida dos antibióticos das classes dos β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e sulfonamidas em leites e tecidos.

KNIGHT et al. (1987) utilizaram o método enzimático para detectar β -lactâmicos, no qual ocorre ligação específica do anel β -lactâmico do antibiótico à enzima DD-carboxipeptidase, inativando-a e interferindo na formação da parede celular. O produto final da reação é medido pelo uso de indicador de cor específico para oxidação e redução, comparando-se a cor final com a cor padrão no cartão do KIT. A presença da cor laranja (redução) indica teste negativo e da cor amarela (oxidação), teste positivo.

Os ensaios com enzimas ligantes são realizados com proteínas penicilina-ligante com receptores de superfície específicos ligados a uma enzima cromogênica e anticorpos monoclonais para a penicilina (MITCHELL et al., 1995). Com a adição da amostra de leite, o *pelet* é reconstituído e durante o primeiro estágio de incubação, ocorrem as ligações com os resíduos de β -lactâmicos e o leite adquire coloração azul. A intensidade da coloração é inversamente proporcional à quantidade de resíduos de β -lactâmico na amostra. LOPES et al. (1998) avaliaram a presença de resíduos de antibióticos β -lactâmicos em 178 amostras de leite pasteurizado utilizando o método do Devol-X. Os resultados indicaram que 7,9% das amostras apresentaram testes positivos para os β -lactâmicos e que a incidência variou com a marca do leite. De acordo com MEDINA et al. (1992) e WYATT (1995), vários pesquisadores demonstraram que os métodos imunológicos são apropriados para a detecção de resíduos de antibióticos nos alimentos.

GAUDIN et al. (2001), baseando-se no princípio da análise de antibiótico por técnicas de imunoensaio, demonstraram o uso dos ensaios com biosensor para estabelecer o screening de nove penicilinas. Os padrões foram previamente tratados com penicilinase e com as soluções de 1,2,4-triazol (2 mols) , dibutilamina (40 mmol) em tampão HBS (*Hepes balanced saline buffer*), pH=7,4. Concluíram que os percentuais de reação com as penicilinas foram altos e que o método apresentou limites de detecção de 4 e 30 $\mu\text{g/L}$ para a penicilina G e ampicilina, respectivamente.

Entretanto, as amostras submetidas ao tratamento enzimático não apresentaram resultados consistentes. Segundo GUSTAVSSON et al. (2004) e BENITO-PEÑA et al. (2005), as técnicas utilizando imunoensaio e cromatografia líquida para a quantificação de β -lactâmicos apresentaram recuperações de 99% e 105%, respectivamente.

ZHI et al. (2001) empregaram a técnica de imunoensaio automatizada em fluxo amperométrico para quantificar cefalexina em leite. O método apresentou limites de detecção e de quantificação de acordo com a regulamentação da União Européia, de 1 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, e foi específico para a cefalexina. Constataram, ainda, que as características do leite em termos de qualidade microbiológica, conteúdo de células somáticas e pH não influenciaram na determinação.

PANOTET et al. (2007) mostraram a determinação de resíduos de β -lactâmicos por imunoensaio empregando um eletrodo modificado com ouro. Concluíram que os parâmetros empregados no método foram satisfatórios para a análise dos resíduos de penicilina G no leite, apresentando baixo limite de detecção ($3,0 \times 10^{-15}$ mol), muito inferior ao limite máximo de resíduo (LMR) de penicilina G no leite ($1,2 \times 10^{-8}$ mol).

SHITANDI & KIHUMBU (2004) avaliaram o limite de detecção observado (LDO) da penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxilina, cefalexina, cefapirina e ceftiofur empregando o teste Beta STAR, utilizando cinco concentrações de cada antibiótico de acordo com seu LMR, estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS (1993). A repetibilidade dos resultados foi satisfatória e concluíram que este método é viável para identificar os resíduos.

Inicialmente a aplicação de métodos cromatográficos para a detecção de resíduos de antibióticos em alimentos foi limitada pela sensibilidade e pela baixa recuperação devido à complexidade da matriz. Somente a partir de 1980, começaram a ser adaptados por MOATS (1984, 1990, 1992, 1994). Existem vários tipos de métodos cromatográficos que vão desde a cromatografia em camada, gasosa à líquida de alta eficiência. Segundo SHAIKH (1993), FARAG (1998) e

MCNEILLY et al. (1996), a natureza polar, a não volatibilidade e a sensibilidade de alguns resíduos de antibióticos ao aquecimento tornaram a cromatografia líquida de alta eficiência umas das técnicas de análise mais utilizadas. Técnicas de maior sensibilidade para detectar e quantificar os resíduos de antibióticos no leite e em tecido, como a espectrofluorimetria (PEREZ-BENDITO et al., 1997), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a eletroforese capilar (EC) e a CLAE acoplada à espectrometria de massas têm sido empregadas com maior frequência (MOATS & HARIK-KHAN, 1995a, b; MOATS, 1997 BRITO & JUNQUEIRA, 2006).

MOATS & ROMANOWSKI (1998a, b) demonstraram a purificação de amostras de leite com acetonitrila e cloreto de tetrametilamônio. Os extratos foram concentrados e injetados na coluna contendo como fase móvel 100% de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4), em fluxo de 1 mL/min, e após 3 minutos foi iniciado o gradiente com 60% de acetonitrila, por 40 minutos. Inicialmente, foi estabelecido o tempo de retenção e o coletor de amostras foi preparado para coletar de 1,5 a 2,0 minutos. Todas as frações coletadas foram evaporadas até 1 mL e submetidas a testes microbiológicos. As frações positivas foram analisadas por CLAE e os β -lactâmicos foram confirmados pelo tratamento com β -lactamase.

Os β -lactâmicos, como penicilina, amoxicilina, ampicilina, cloxicilina, ceftiofur e cefapirina, foram determinados previamente por CLAE e derivatizados separadamente com anidrido acético ou anidrido benzóico, solução de cloreto de mercúrio e 1,2,4-triazole a 65°C, por 3 min, seguido de detecção UV a 325 nm. A substituição do reagente de acetilação pelo anidrido benzóico permitiu aumentar a quantidade de amostra e reduzir o tempo de análises (BOISON et al., 1994; SORENSEN et al., 1997; BOISON & KENT, 1998).

O uso de detectores eletroquímicos para detecção de antibióticos com o grupo enxofre foi demonstrado por HANKO et al. (2001). O método foi linear para a faixa de 0,01 a 10000 mg/L e concluíram que o emprego do detector eletroquímico para os antibióticos que oxidam ao se aplicar um potencial pode reduzir os efeitos dos interferentes endógenos das amostras.

Procedimentos de limpeza como a centrifugação com acetonitrila foi usada por

SORENSEN & SNOR (2000) para determinar as cefalosporinas: cefoperazone, cefquinona e ceftiofur em leite bovino cru. Extração em fase sólida utilizando SepaK C₁₈, seguida de identificação e quantificação por CLAE com detector UV a 323 nm, foi amplamente empregada para amoxicilina, penicilina G, ampicilina, oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina (COOPER et al., 1995; ROSE et al., 1997; SORENSEN et al., 1997; SCHERMERHORN et al., 1998; TAKEBA et al., 1998). O emprego do ácido tricloroacético para a desproteinização dos extratos foi relatado por ANG & LUO (1997), entretanto, o ácido tricloroacético acarreta a hidrólise do anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. ANG et al. (1996,1998) e BOISON & KENT (1998) determinaram amoxicilina em tecidos de peixes por CLAE utilizando derivatização pré-coluna com formaldeído, obtendo 50% de recuperação.

A identificação e a quantificação dos resíduos de β -lactâmicos, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, foi realizada por comparação do tempo de retenção do composto, com o fornecido pelo padrão, pela co-cromatografia e pelo perfil dos espectros de absorção obtidos no DAD (TAKEBA et al., 1998). Técnicas mais sofisticadas foram usadas por STRAUB & VOYKSNER (1993), TYCZKOWSKA et al. (1993), STRAUB et al. (1994) e VOYKSNER et al. (1994) em que os β -lactâmicos foram confirmados por meio do espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência.

VERDON & COUEDOR (2000) determinaram as cefalosporinas: cefoquinona, defalixina, cefapirina e ceftiofur por CLAE em músculo bovino. A extração foi realizada com isooctano e a purificação em cartucho C₁₈, previamente ativado com metanol e tampão acetato de amônio. A validação foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pela Decisão da EU nº 93/256 (EC, 1993; 2002). De acordo com os resultados obtidos, os níveis de antibióticos estavam dentro dos LMR estabelecidos. A CLAE tem sido o método comumente utilizado para a determinação de antibióticos cefalosporinas e cloranfenicol em leite (CANIOU et al., 1995; PFENNING et al., 1998; SCHENCK & CALLERY, 1998). Entretanto, os LMR estabelecidos pela União Européia e pelo FDA, os interferentes endógenos da matriz e a possível presença de metabólitos levaram à utilização de técnicas mais sensíveis. Recentemente, a

introdução da técnica de ionização por *eletrospray* (IES) e à pressão atmosférica (IAPA) contribuiu para o avanço no estabelecimento de procedimentos analíticos para os resíduos de antibióticos (DELÉPINE et al., 1996; HELLER, 1996; HOLSTEGE et al., 2002; SCHNEIDER & DONOGHUE, 2002; WANG, 2004).

A extração dispersiva em fase sólida tem sido utilizada por vários pesquisadores para a purificação de amostras de leite e carnes. Muitos relataram que essa acelera a limpeza da amostra melhor que a SPE convencional (BARKER, 2000, COLLINS et al. 2005, COLIN et al. 2000, CLARET et al, POSYNIK et al.2005.). A identificação e quantificação de amoxicilina, deacetilcefapirina, (um metabólito da cefapirina), desfuroilceftiofur cisteína dissulfeto (metabólito do ceftiofur), amoxicilina, ampicilina, cefazolina, penicilina G, amoxicilina, oxacilina, cloxacilina, nafcillin, e dicloxacilina por CLAE/EM/EM. Os β -lactâmicos alcançaram recuperações acima de 70%, exceto para o metabólito que ficou em torno de 58% (FAGERQUIST et al, 2005).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, K.L.; MOATS, W.A.; RUSHING, J.E.; WESEN, D.P.; PAPICH. M.G. Ampicillin and amoxicillin residue detection in milk, using microbial receptor assay (CharmII) and liquid chromatography methods, after extra-label administration of the drugs to lactating cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 73-78, 1992.
- ANG, C.Y.; LUO, W. Rapid determination of ampicillin in bovine by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 1, p. 25-30, 1997.
- ANG, C.Y.; LUO, W.; HANSEN, E.B.; FREEMAN, J.P.Jr.; THOMPSON, H.C.Jr. Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with precolumn formaldehyde liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 2, p. 389-396, 1996.

ANTIBIÓTICOS. Disponível em: <<http://www.jonasbam.hpg.ig.com.br/ciencia>

BARKER, S.A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**, 880, p., 63-68, 2000.

BENITO-PEÑA, E.; BOISON, J.O. KENG, L.J.Y. Improvement in the multiresidue liquid chromatographic analysis of residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 6, p. 1267-1272, 2005.

BISHOP, J.R.; BODINE, A.B.; O'DELL, G.D.; JANZEN, J.J. Quantitative assay for antibiotics used commonly in treatment of bovine infections. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 3031-3036, 1985.

BOISON, J.O.; KENT, L.J.Y. Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 6, p. 1113-1120, 1998.

BOISON, J.O.; SALISBURY, C.D.C.; CHAN, W.; MACNEIL, J.D. Determination of penicillins G residues in edible animal tissues by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 74, n. 3, p. 497-501, 1994.

BORGES, G.T.; SANTANA, A. P.; MESQUITA, A.J.; MESQUITA, S.Q.P.; SILVA, L.A.F.; NUNES, V.Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido em comercializado no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 59-63, 2000.

BUZALSKI-HONKANEN, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: **International Dairy Federation standard (IDF/FIL)**. Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. Brussels: IDF, 1997. Special Issue, p. 27-34.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998. Dispõe sobre a proibição de cloranfenicol... **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 set. 1998, p.38.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado-PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 dez. 1999, Seção 1, p. 213

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto-Lei

- nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 out. 1969.
- BRITO, M.A.V.P., ARCURI, E.F., BRITO, J.R.F. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M.C.; MARTINS, C.E.; DERESZ, F.; BRITO, J.R.F.; FREITAS, A.F.; PORTUGAL, J.A.B.; COSTA, C.N.; MINASLEITE. 2000, Juiz de Fora. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p.83-94, 2000.
- BRITO, R.; B.; JUNQUEIRA, R.G. Determination of Beta-Lactam residues in milk by high performance liquid chromatography. **Brazilian Archives Biology Technol.** v. 49, p 1-10, 2006.
- BRUMFITT, W.; KOSMIDIS, J.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; JAMES, N.G. Cefoxitin and cephalothin: antimicrobial activity, human pharmacokinetics, and toxicology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, n. 3, p. 290-294, 1974.
- BRYSKIER, A.; PROCYK, T.; LABRO, M.T. Cefodizime, a new 2-aminothiazolyl cephalosporin: physicochemical properties, toxicology and structure activity relationships. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, Supl. C, p. 1-8, 1990.
- CANA-BRAVA, H.A.N.; GÓMEZ, F.G.; LARREA, M.I.S.A. Antimicrobianos em animais produtores de alimentos. **Revista Brasileira do Zebu e seus Cruzamentos**, a. 1, n. 6, p. 1-3, 2002.
- CANIOU, I.; NIKOLAIDES, E.; TSOUKALI, H.; STRATIS, J.A.; ZACHARIADIS, G.A. Determination of chloramphenicol residues in meat samples by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 17, p. 3519-3527, 1995.
- CAPRILE, K.A. The cephalosporin antimicrobial agents: a comprehensive review. **Journal Pharmacology**, v. 3, p. 1-5, 1998.
- CARLSSON, A.; BJORCK, L. Charm test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assays in herd milk. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 1, p. 32-36, 1991.
- CE. Commission of the European Communities. Council Directive 96/23/EC de 29 de abril de 1996 Dispõe sobre medidas para controlar determinadas substâncias e

- seus resíduos nos animais vivos e seus produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e Decisão 89/187/CEE e 91/664/CEE, pp.10-32. **Official Journal of the European Union**, L125, 23/05/1996.
- CEE. European Economic Community. Regulamento da Comunidade Económica Europeia nº 2377/90 do Conselho de 26 de junho de 1990. Prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. **Official Journal of the European Communities**, 1990, R 2377, p. 1-119.
- CHAM, S.E.; CHI, R. Rapid screening assay for beta-lactam antibiotics in milk: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 65, p.1186-1192, 1982.
- CHAM, S.E.; CHI, R. Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, p.3046-316, 1988.
- CHAMBERS, H.F., SANDER. M.A. Fármacos antimicrobianos. In: GILMAN, A.G., RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, A. (Eds) **As bases da farmacologia terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro, 1996, cap. 43, p. 757-776
- CHEN, H.C.; CHANG, T.C. Detection of penicillin G in milk using a conductimetric method. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p.1515-1520, 1994.
- CLARET H., DELLA W.M.S., HUBERT P.O.T., LUCY, P.K.C., SYLVIA M.P.S. Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, 1061, p.,123–13, 2001.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa.jsp>>. Acesso em: 28 de agosto de 2008.
- COLLIN F.P., AJITH D.G., REVATHY. S. Review. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, 885, p. 17-39, 2000.
- COLLIN R.A., HEIDI S.R., WEN-HSIN W. Review. Complexities in tetracycline

- analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1075, p., 23-32, 2005.
- COOPER, A.D.; CREASER, C.S.; FARRINGTON, W.H.H.; TARBIN, J.A.; SHEARER, G. Development of multi-residue methodology for the HPLC determination of veterinary drugs in animal tissues. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 2, p. 167-176, 1995.
- COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 15-17, 1996.
- DELÉPINE, B.; HURTAUD-PESSEL, D.; SANDERS, P. Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 2, p. 397-404, 1996.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 2002, L 221/8.
- EC. European Commission. Comissão de decisão nº 2003/181/EC de 13 de março de 2003 que estabelece o limite mínimo de desempenho requeridos dos métodos analíticos para análises de alguns resíduos em alimentos de origem animal. **Official Journal of the European Communities**, 2003, L 71.
- EC. European Commission. Comissão de Decisão nº 315/93 do Conselho, de 8 de fevereiro de 1993, que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Official Journal** Bruxelas nº L 37, 13 fev. 1993. p. 1–3. Edição especial finlandesa: Capítulo 15, Fascículo 12, p. 78. .Edição especial sueca: Capítulo 15, Fascículo 12, p. 78.
- EECKHOUTTE, M. Antibiotiques et alimentation humaine. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 129, n. 5, p. 717-740, 1978.
- EMA - European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Cephalixin: summary-report. In: **The European Agency for the evaluation of medicinal products veterinary medicines and information technology**. London, EMA/MRL/745/01, 2001. p. 1-6.

- FAGUNDES, C.M. *Interferência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência nos leites tipo "B" e "C" consumidos em Belo Horizonte*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1980. 48 p. (Tese de Mestrado em Medicina Veterinária).
- FAGERQUIST, C.K., LIGHTFIELD, A.R., LEHOTAY, S.J. Confirmatory and quantitative analysis of b-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 1473-1482, 2005.
- FAGUNDES, C.M.; MOLIN, I. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Informe Agropecuário**, v. 13, n. 155, p. 24-30, 1998.
- FARAG, S.A. Simultaneous liquid chromatographic analysis of the β -lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil, cephalixin, ampicillin and cephradine in solution. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 2, p. 381-385, 1998.
- FERREIRA, P.M.; PESSOA, J.M. Antibioticoterapia em medicina veterinária. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. **Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária**, 1988. 57 p.
- GAUDIN, V.; FONTAINE, J.; MARIS, P. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: Comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment. **Analytical Chimica Acta**, v. 436, p. 191-198, 2001.
- GORNI, R.; CABRINI, S. Dificuldades e demandas da indústria sobre testes para detecção de resíduos de antibióticos em leite. In: **Diagnósticos da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Seminário da Qualidade do Leite. Juiz de Fora, 2003. p. 99 -102.
- GOWIK P. Criteria and requirements of commission decision 2002/657/EC **Bulletin of the International Dairy Federation**, vol. 383, p. 52, 2003.
- GREENWOOD, D. Historical introduction. In: E.C. LIVINGSTONE, O'GRADY, F.; LAMBERT, H.P.; FINCH R.G.; GREENWOOD, D. (Ed.) **Antibiotic and chemotherapy**, Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 2-9.

- GRUNWALD, L.; PETZ, M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, n.1-2, 25, p. 73-79, 2003.
- GUSTAVSSON, E.; DEGELAEN, J.; BJURLING, P.; STERNESJO, A. Determination of β -lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2791-2796, 2004.
- HALBERT, L.W.; ERSKINE, R.J.; BARTLETT, P.C.; JOHNSON, G.L. Incidence of false-positive results for assays used to detect antibiotics in milk. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 8, p. 886-888, 1996.
- HANKO, V.P.; LACOURSE, W.R.; DASENBROCK, C.O.; ROHRER, J.S. Determination of sulfur-containing antibiotics using high performance liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Drug Development Research**, v. 53, n. 4, p. 268-289, 2001.
- HELLER, D.N. Determination and confirmation of pirlimycin residue in bovine milk and liver by liquid chromatography/termospray mass spectrometry: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 5, p. 1054-1061, 1996.
- HIRD, J.F.; KNIFTON, A. Chloramphenicol in veterinary medicine. **Veterinary Rec**, v. 119, p. 248-256, 1986.
- HOLSTEGE, D.M.; PUSCHNER, B.; WHITEHEAD, G.; GALEY, F.D. Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 406-411, 2002.
- IARC-International Agency for Research on Cancer Chloramphenicol. In: **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon, 1990. v. 50, p. 169-193.
- JACKMAN, R.; CHESHAM, J.; MITCHELL, S.J.; DYER, S.D. Performance of a rapid ELISA for penicillin G in milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 43, n. 4, p. 93-95, 1990.
- JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Monography on residues of antibiotic**. Roma ,1999. paper, 45/61; 52/17.
- KNIGHT, A.H.; SHAPTON, N.; PRENTICE, G.A. Collaborative trial of the penzyme assay: a rapid method for the detection of beta-lactam antibiotics in milk. **Journal**

- of the Society of Dairy Technology**, v. 40, n. 2, p. 30-33, 1987.
- KRESS, C.; SEIDLER, C.; KERP, B.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, 275-279, 2007.
- LAMB, J.M.; COOK, M.D. Comparative evaluation of the STAR test method with the Difco disc-assay method for detecting inhibitory substance in raw milk. **Food Technology in New Zealand**, v. 17, n. 11, p. 20-21, 1982.
- LEDERER, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar intoxicações alimentares**. São Paulo: Manole, 1991, p. 205-215. In: NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.
- LLOYD, D.N.; VAN DER MERWE, D. The use of a diffusion test for the detection of antibiotics in the slaughter stock. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 58, n. 4, p. 183-186, 1987.
- LOPES, L.T.; GANDARA, A.I.N.; CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibiótico em leite comercializado na cidade de Campinas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, n. 301-303, p. 64-67, 1998.
- MANHÃES, M.F.; UÉBE, P.M.; TEIXEIRA, G.N.; LESSA, S.S.A.; CARLOS, L.A.; MARTINS, M.L.L. Determination of cloxacillin antibiotic residues in cow milk with high somatic cells counts. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 1, n. 1, p. 13-24, 2008.
- MCNEILLY, P.J.; REEVES, V.B.; DEVEAU, E.J.I. Determination of ceftiofur in bovine milk by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 4, p. 844-851, 1996.
- MEDINA, M.B.; BARFORD, R.A.; PALUMB, M.S.; ROWE, I.D. Evaluation of commercial immunochemical assays for detection of sulfamethazine em milk. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 284-290, 1992.
- MELLA, S.M.; ZEMELMAN, C.M.; BELLO, H.T.; DOMINGUEZ, M.Y.; GONZALEZ, G.R.; ZEMELMAN, R.Z. Propriedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de

- cuarta generación. **Revista Chilena de Infecciones**, v. 12, n.1, p. 7-19, 2001.
- MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and performance. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.
- MITCHELL, M.; BODKIN, B.; MARTIN, J. Detection of beta-lactam antibiotics in bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 577-578, 1995.
- MOATS, W.A. Advances in determination of antibiotic residues. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 1, p. 1-5, 1997.
- MOATS, W.A. Determination of cloxacillin and penicillin V in milk using an automated liquid chromatography cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 2, p. 257-260, 1992.
- MOATS, W.A. Determination of penicillin G and cloxacillin residues in beef and pork tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, n. 347, p. 311-318, 1984.
- MOATS, W. A. Liquid chromatographic approaches to antibiotic residue analysis. **Journal of AOAC International**, v. 73, n. 3, p. 343-347, 1990.
- MOATS, W.A.; HARIK-KHAN, K. Liquid chromatographic determination of β -lactamic antibiotics in milk: a multiresidue approach. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 1, p. 49-54, 1995b.
- MOATS, W.A.; HARIK-KHAN, R. Identification and measurement of β -lactam antibiotics residues in milk: integration of screening with liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 4, p. 978-986, 1995a.
- MOATS, W. A.; ROMANOWSKI, R. D. Determination of penicillin G in beef and pork tissues using an automated LC cleanup. **Journal of Agriculture and Food**, v. 46, p. 1410-1413, 1998a.
- MOATS, W.A.; ROMANOWSKI, R.D. Multiresidue determination of β -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatography fractionation for clean up. **Journal of Chromatography A**, n. 83, p. 237-247, 1998b.

- MOATS, W. A. Determination of ampicillin and amoxicillin in milk with an automated liquid chromatography cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 1, p. 41-45, 1994.
- MOREIRA, L.B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul, AMRIG**, Porto Alegre, v. 48, n. 2, p. 118-120, 2004.
- MORETAIN, J.P.; BOISSEAU, J. Elimination of aminoglycoside antibiotics in milk following intramammary administration. **The Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 3, p. 112-117, 1993.
- NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.
- NAVRÁTILOVÁ P. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review. **Czech Journal of Food Sciences**, 26 :393-401, .(2008) p. 1.
- PAIVA NETTO, J.V. **Antibióticos e quimioterápicos em medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989. 181p.
- PANOTE T., DAWAN S., KANATHARANA, P.; ASAWATRERATANAKUL, P. Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, n. 15., 688-694, 2007.
- PEREZ-BENDITO, D.; GÓMEZ-HENS, A.; GALA, B. Simultaneous determination of ampicillin and tetracycline in milk by using a stopped-flow/T-format spectrofluorimeter. **Talanta**, v. 44, p. 1883-1889, 1997.
- PFENNING, A.P.; MADSON, M.R.; ROYBAL, J.E.; TURNIPSEED, S.B.; GONZALES, S.; HURLBUT, J.A.; SALMON, G.D. Simultaneous determination of chloramphenicol, florphenicol and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 4, p. 714-720, 1998.
- POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J., MITROWSKA K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1087 p. 259–264, 2005.

- ROSE, M.D.; TARBIN, J.; FARRINGTON, W.H.H.; SHEARER, G. Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations: II. Determination of amoxicillin and ampicillin in liver and muscle using cation exchange and porous graphitic carbon solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 2, p. 127-133, 1997.
- SALTER, R.S.; LEGG, D.; OSSANNA, N.; BOYER, C.; SCHEEMAKER, J.; MARKOVSKY, S.S.J. Charm safe-level β -lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephapirin and penicillin G in raw commingled milk. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 1, p. 29-53, 2001.
- SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **Journal of Chromatography A**, n. 812, p. 99-109, 1998.
- SCHERMERHORN, P.G.; PAK-SIN, C.; NGOH, M. Determination of cephapirin and ceftiofur in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 5, p. 973-977, 1998.
- SCHNEIDER, M.J.; DONOGHUE, D.J. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 780, p. 83-92, 2002.
- SHAIKH, B. Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. **Journal of Chromatography**, n. 643, p. 369-378, 1993.
- SHITANDI, A.; KIHUMBU, G. Laboratory evaluation of the tube test detection limits for β -lactamic residues in Kenyan milk. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 82-87, 2004.
- SILVA, T.J. P.; SENA, M.C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo "B" e especial 3,2% de gordura consumido em Belo Horizonte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n. 235, p. 7-12, 1984.
- SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal. 2004. Disponível em www.sindan.org.br/sindan; acessado em 2 de dezembro de 2005.
- SORENSEN, L.K.; RASMUSSEN, B.M.; BOISON, J.O.; KENG, L. Simultaneous determination of six penicillins in cows raw milk by a multiresidue high-

- performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, n. 694, p. 383-391, 1997.
- SORENSEN, L.K.; SNOR, L.K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 882, p. 145-151, 2000.
- SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999. p. 391-395.
- SETFORD, S.J.; VAN E.S, R.M.; BLANKWATER, Y.J.; KROGER, S. Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid β -lactamic quantification in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 398, p. 13-22, 1999.
- STRAUB, R.; LINDER, M.; VOYKSNER, R.D. Determination of β -lactam antibiotics residues in milk :using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66 p. 3651-3658, 1994.
- STRAUB, R.; VOYKSNER, R.D. Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephapirin by high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, n. 647, p. 167-181, 1993.
- TAKEBA, K.; FUJINUMA, K.; MIYAZAKI, T.; NAKAZAWA, H. Simultaneous determination of β -lactamic antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 812, p. 205-211, 1998.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos para estudantes de medicina. 3. ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 1988, 348p.
- THOMPSON, T.D.; QUAY, J.F.; WEBBER, J. A. Cephalosporin group of antimicrobial drugs. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 185, n. 10, p. 1109 -1114, 1984.
- TYCZKOWSKA, K.L.; VOYKSNER, R.D.; STRAUB, R.F.; ARONSON, A.L. Simultaneous multiresidue analysis of β -lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection and confirmation by electrospray mass spectrometry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 77, p. 1122-1131, 1993.

- VERDON, E.; COUEDOR, P. **HPLC/UV determination of residues of cephalosporins in pork and beef muscle tissues.** (AFSSA-Fougères) Laboratory for Researches and Studies on Veterinary Drugs and Disinfectants, Community Reference Laboratory for Antimicrobial in Food from Animal Origin, BP 90203, 35302. Fougères, France: 2000.
- VERMUT, A.E.M.; STADHOUDERS, J.; LOEFFEN, G.J.M.; BAKKER, R. Improvements of the tube diffusion method for detection of antibiotics and sulfonamides in raw milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 47, n. 1, p. 31-40, 1993.
- VOYKSNER, R.D.; TYCZKOWSKA, K.; ARONSON, A.L. Development of analytical methods for some penicillins in bovine milk by ion-pair chromatography and confirmation by thermospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, n. 567, p. 399-404, 1994.
- WANG, J. Determination of five macrolide antibiotic residues in honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 171-181, 2004.
- WYATT, G.M. Antibody-based detection of microbial analytes in foods: aspects of development. **Food and Agriculture Immunology**, v. 7, p. 55-65, 1995.
- ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; BROWN-CROWDER, I. Evaluation of screenintests for detection of antibiotic residues in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 21, p. 155-160, 1996.
- ZHI, Z.L.; MEYER, U.J.; VAN DEN BEDEM, J.W.; MEUSEL, M. Evaluation of an automated and integrated flow-through immunoanalysis system for the rapid determination of cephalexin in raw milk. **Analytical Chimica Acta**, v. 442, p. 207-219, 2001.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL – QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANFENICÓIS EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL – QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANFENICÓIS EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA* Helena Teixeira GODOY**

*Fundação Ezequiel Dias / Instituto Octávio Magalhães / Divisão de Vigilância Sanitária / Serviço de Química - Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira – 30510-010, Belo Horizonte-MG – Brasil.

**Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – 13083-970, Campinas-SP – Brasil.

RESUMO: Esta pesquisa descreve o procedimento de validação intralaboratorial de um método para identificar e quantificar resíduos de anfenicóis em leite UHT e em pó integrais por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas. A análise dos anfenicóis consistiu da extração com tampão McIlvaine modificado e purificação em cartucho HLB (*hidrofilic-lipofilic-balance*). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Simpack, C₁₈ 100 mm x 2,0 mm x 5 µm utilizando sistema isocrático de eluição, composto por solução de ácido fórmico 0,1% pH 6,5:metanol (60:40). A fonte de ionização foi a *eletronspray*, modo SIM negativo, voltagem 3,0 kv e temperatura da CDL (*curved desoldadion line*) e bloco a 270°C. A quantificação foi realizada por padronização externa. O modelo de regressão linear proposto para os padrões e efeito matriz foi avaliado estatisticamente pelo tratamento dos valores extremos pelo teste de Jackknife e as premissas de normalidade, homocedasticidade, independência dos resíduos e ajuste do melhor modelo de linearidade pelos testes de Ryan-Joiner, Brown-Forsythe, Durbin-Watson e análise de variância, respectivamente. As inclinações e interseções das curvas do analito em solventes e matriz foram comparadas pelo teste de t de Student, com verificação prévia da homogeneidade das variâncias pelo teste de Fischer. Os dados de recuperação foram avaliados pelo teste de Grubbs para verificação da falta de exatidão e a repetitividade intermediária pela análise de variância. Os limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção foram determinados

pelos resultados de recuperação e ruídos obtidos para amostras brancas. Os resultados mostraram que o método estabelecido apresentou eficiência satisfatória ao uso pretendido.

Palavras-chave: validação, leite fluido, antibióticos e métodos cromatográficos

ABSTRACT: This study describes the procedure for intralaboratory validation of the method to identify and quantify amphenicols residues in UHT milk and powder milk full of high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer. The analysis of amphenicols consisted of extraction with McIlvaine buffer modified and purification in HLB (*hidrofilic-lipofilic-balance*) cartridge. The chromatography separation was performed in column Simpack, C₁₈ 100 mm x 2,0 mm x 5 µm using isocratic elution system composed of formic acid 0,1% pH 6,5:methanol (60:40). The source of ionization was eletronspray, rather negative mode, voltage 3.0 kv and the CDL and block temperature of 270°C. Quantification was performed by external standardization. The linear regression model proposed for the standards and matrix effect was evaluated statistically by the treatment of extreme values by Jacknife and test the assumptions of normality, homoscedasticity, independence of the residues and the best fit linear model of the Ryan-Joiner tests, Brown -Forsithe, Durbin-Watson and analysis of variance, respectively. The slopes and intersections of the curves of the analyte in solvent and matrix were compared by Student t test, with prior verification of the homogeneity of variances by the test of Fischer. Data recovery were evaluated by the Grubbs test to verify the accuracy and lack of repeated intermedia by analysis of variance. The detection limits of quantification, decision-making and capacity of detection were determined by the results of recovery and noise obtained for blank samples. The results showed that the established method showed satisfactory performance to intended use

Keywords: validation, fluid milk, antibiotics and chromatographic methods.

1. INTRODUÇÃO

A política de globalização tem influenciado fortemente o cenário da produção agropecuária, tornando visível a necessidade de os países se manterem ou de se tornarem competitivos na atividade, conseqüentemente, exigindo que os países evoluam nas tecnologias de produção. Os artifícios lançados para se atingir tais objetivos têm despertado grande atenção da opinião pública frente à contaminação de alimentos, especialmente os básicos, como o leite, visto que atua diretamente na saúde do consumidor.

Atualmente, o uso de antibióticos em animais de produção vem preocupando a população mundial. Segundo PALERMO (2004), o aparecimento da encefalopatia espongiforme bovina (EEB) em 1995, 1996 e 2000 e a contaminação de carne de frango com dioxina despertaram a preocupação dos consumidores de todo o mundo e, em especial dos europeus, em relação à necessidade de segurança no que diz respeito à qualidade dos alimentos de origem animal. Para ele, a constatação do aumento de prevalência/incidência de microorganismos resistentes aos antimicrobianos e a possível relação deste fato com o uso de antibióticos em medicina veterinária e, muito especialmente, quando utilizados como aditivos zootécnicos, consistirá em uma nova e terceira crise, o que vem complicando a situação do agronegócio.

Esses fatos levaram à adoção de medidas decisivas que propiciaram a manutenção da qualidade dos alimentos de origem animal, entre elas, certificado de procedência, rastreabilidade, condições de alojamento e bem-estar dos animais, ausência de resíduos de substâncias químicas e garantias ligadas à segurança e qualidade dos alimentos fornecidos aos animais (PALERMO, 2004).

Nesse sentido, a disponibilidade de métodos analíticos para monitorar os resíduos de substâncias químicas nos alimentos se faz necessária. Assim, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 253/03, criou-se o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMVet),

que visa estabelecer metodologia analítica para determinar resíduos de antiparasitários e antimicrobianos (BRASIL, 2003).

Em geral, as técnicas mais utilizadas para determinação de resíduo e de outros medicamentos veterinários em alimentos são cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa com detectores de captura eletrônica (CG-DCE) e espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV), espectrometria de massas (CLAE-EM). Os níveis de detecção devem ser iguais ou inferiores aos limites máximos de resíduos (LMRs) para aquelas substâncias para os quais são estabelecidos. Para as substâncias cujo nível de tolerância é zero, considera-se o limite de detecção do método, uma vez que não apresente uma resposta inequívoca (CEE, 1990). Entretanto, European Commission (EC, 2003) estabeleceu que o limite de quantificação requerido para um método analítico seja de $0,30 \text{ g kg}^{-1}$, para substâncias que estão proibidas ou não autorizadas ao uso em leite, mel, carne, urina, ovos e produtos de piscicultura. No Brasil, a tolerância dos antibióticos da classe dos anfenicóis (cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol) é zero para gado de corte e leiteiro.

As tradicionais técnicas analíticas compreendem os métodos microbiológicos, que se fundamentam na inibição do crescimento de microorganismos sensíveis, em placas de ágar semeadas, que apresentam baixa especificidade e muitas vezes são expressos por classe de antibióticos que podem gerar resultados falso-positivos, exigindo a sua confirmação.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas tem sido uma técnica importante na análise de resíduos, visto possibilitar a separação simultânea de classes diferentes de resíduos de antibióticos, bem como seus produtos de degradação e metabólitos (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; PEZZA et al 2006; MARTINS et al, 2006). Diversos pesquisadores empregaram na etapa de extração dos antibióticos em leite solventes orgânicos e centrifugação, seguida da desproteinização com ácido sulfúrico e tungstato para precipitar as proteínas e separar os lipídeos, com posterior purificação em cartuchos Sepak C₁₈ (TARBIN et al., 1995; OKA et al., 2000; CINQUINA et al., 2003; ANDERSON et al., 2005). Essa

etapa requer muitos cuidados devido à presença dos interferentes endógenos que podem ser coeluidos (BOVANOVÁ & BRANDSTETEROVÁ, 2000). Segundo CORREGE et al. (1994), a complexidade da matriz associada à baixa concentração de resíduos pode, muitas vezes, levar a resultados falsos positivos devido às possíveis reações cruzadas dos interferentes. A fase estacionária mais empregada para a separação de resíduos de antibióticos tem sido a fase reversa com detecção em ultravioleta e arranjo de diodo (SORENSEN et al., 1997; SORENSEN & SNOR, 2000; CINQUINA et al., 2003, MARTINS et al. 2006, PEZZA et al. 2006).

Atualmente, o reconhecimento da necessidade de um laboratório mostrar a qualidade das medições químicas, através da rastreabilidade, confiabilidade e comparabilidade, vem sendo exigida por diversos órgãos governamentais. Para que a resposta de um método analítico não seja inequívoca, o mesmo deve ser validado. A validação do método analítico deve ser documentada em cada etapa visando garantir a rastreabilidade da análise e que é adequado ao uso pretendido. A validação tem sido discutida em diversos trabalhos da literatura (THOMPSON, 2000 THOMPSON, et al., 2002 e 2006; SHABI, 2003; LEITE, 2002) e conceituada de várias formas pelos órgãos reguladores (CODEX, 1995, 2002 e 2008; ISO 2005, EURACHEM, 1998), contudo, os parâmetros podem variar em função da área de aplicação, da concentração do analito, do objetivo e da natureza do método.

Embora seja clara a necessidade de métodos validados, a forma para realizá-la não está bem definida e nem acordada internacionalmente, apesar dos esforços de organismos internacionais pela harmonização dos procedimentos (NATA, 1997; ICH, 1996; INMETRO, 2002 e 2003; VAN OVERMEIRE et al 2004). Questões como quais parâmetros de desempenho a serem estudados, quais os procedimentos específicos que devem ser utilizados para avaliar cada parâmetro e quais os critérios de aceitabilidade devem ser definidos para cada parâmetro em particular precisam ser harmonizados (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Segundo RIBANI et al.(2004) é possível distinguir dois tipos de validação, no próprio laboratório "*in house validation*" e a completa "*full validation*". A diferença é que, na completa, determina-se o estudo da reprodutibilidade e de incerteza expandida da metodologia. Cabe ressaltar que o processo de validação está embasado em normas internacionais e nacionais,

portanto existem razões legais e técnicas para os laboratórios de ensaios se tornarem acreditados tanto no âmbito nacional como internacional.

O processo de validação de métodos para análise de resíduos de antibióticos consiste na avaliação dos parâmetros de desempenho analítico (INMETRO, 2003 e THOMPSON, 2000) como seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Segundo INMETRO (2003) e THOMPSON (2000) esses termos são denominados características de desempenho, sendo importante que os parâmetros sejam utilizados de acordo com o objetivo do método a validar.

Dentre os critérios citados a seletividade é relevante, porque avalia o grau de interferência de espécies como outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedade similares que possam estar presentes. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004). A seguir, tem-se a linearidade, a exatidão e a precisão. BRITO et al. (2001) demonstraram a importância da exatidão e precisão na validação de métodos de análise de resíduos de pesticidas, estimando erros e variações embutidos nos resultados analíticos.

Tendo em vista o contexto que envolve a utilização de antibióticos em animais produtores de alimentos, o presente estudo consistiu em desenvolver, otimizar e validar a metodologia para análise de multirresíduos dos antibióticos cloranfenicol, tianfenicol, e florfenicol, em leites UHT e em pó integrais, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em detector de massas.

2. MATERIAIS

2.1. Reagentes, solventes e materiais diversos

Foram utilizados os padrões de cloranfenicol (Sigma lote 16H5955, 99,0%), florfenicol (Sigma, lote F1427, 99,0%) e tianfenicol (Fluka lote 428903/1, 99,0%), filtros para amostras e para a fase móvel da Millipore[®] de 0,45µm de poros e 13mm de diâmetro e de 0,45µm e 47mm de diâmetro, respectivamente. Os cartuchos de

extração em fase sólida foram HLB da Waters® de 200 mg e capacidade de 6 mL e Kit ELISA , de marca Ridascreen. Os reagentes foram de grau analítico e os solventes para a cromatografia, grau cromatográfico.

2.2. Vidraria

Foram utilizadas vidrarias com certificado da Rede Brasileira de Metrologia e as de uso comum do laboratório.

2.3. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica, vórtex, manifold, centrífuga modelo CR22G (HITACHI), evaporadora rotativa (JOAN), ultra-purificador de água Milli-Q (MILLIPORE), ultra-som e um cromatógrafo a líquido modelo Class Vp (SHIMADZU), composto de sistema desgaseificador a hélio, duas bombas, injetor automático de 1 a 50 μ L de capacidade, e detector de massas com fonte de ionização por *eletrospray* e simples quadrupolo, modelo LCMS-210A (SHIMADZU). Para a separação utilizou-se coluna SHIMPAK, C₁₈ 150 mmx 2,0 mm x 5 μ m. O sistema foi acoplado a um software e a uma estação de controle para aquisição e tratamento de dados.

2.4. Preparo dos Padrões

2.4.1. Solução padrão estoque dos anfenicóis

As soluções estoques dos padrões de antibióticos foram preparadas pesando separadamente, em balança analítica, 10 mg de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol. A seguir, foram dissolvidos em metanol, grau cromatográfico, e transferidos quantitativamente para um balão de volumétrico de 10 mL. As soluções foram homogeneizadas, transferidas para frascos e guardadas em freezer a -18°C . A concentração desta solução foi de 1 mg/mL.

2.4.2 Solução padrão intermediária I de anfenicóis

Pipetou-se separadamente 25 μ L da solução padrão estoque de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol (1,0 mg/mL), utilizando pipeta automática de 10-100 μ L para

balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água ultrapura, homogeneizou-se e transferiu-se para frascos âmbar de 10 mL. A concentração final de cada solução intermediária de cloranfenicol florfenicol e tianfenicol foi de 250 ng/mL.

2.4.3. Solução intermediária II de tianfenicol

Pipetou-se 250 µL solução estoque padrão de tianfenicol com pipeta automática de 100 -1000 µL para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água ultrapura, homogeneizou-se e transferiu-se para frascos âmbar de 10 mL. A concentração final das soluções intermediárias de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol foi de 2,5 µg/mL

2.4.4. Solução de pool do padrão de anfenicóis

Pipetou-se 25 µL de cada solução estoque padrão de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol usando pipeta automática de 10-100 µL para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água ultrapura, homogeneizou-se e transferiu-se para frascos âmbar de 10 mL. A concentração final do pool de padrões dos anfenicóis foi de 250 ng/mL

2.4.5. Solução de pool de padrões de anfenicóis para o efeito matriz.

Pipetou-se 80, 100, 150, 200, 400, 500, 750 e 1000 µL da solução padrão intermediária I de cloranfenicol (250 ng/mL); 200, 250, 300, 400, 600, 700 e 800 µL da solução padrão intermediária I de florfenicol (250 ng/mL); 80, 100 e 250 µL da solução padrão intermediária I de tianfenicol (250 ng/mL) e 100, 250, 500, e 750 µL da solução padrão intermediária II de tianfenicol (2,5 µg/mL). Cada volume destes foi colocado em balão volumétrico de 25 mL, tendo o volume completado com tampão formiato pH=6,5.

2.5. Preparo de reagentes

2.5.1 Solução de extração - Tampão McIlvaine modificado

Pesou-se 5,825 g de fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4), 2,2 g de acetato de amônio ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) e 18,6 g de EDTA, em um béquer, ao qual adicionou-se, aproximadamente, 400 mL de água ultrapura, agitando-se até

completa dissolução. O pH foi ajustado a 5,8 com ácido acético ou NH_4OH . Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 500 mL completando-se o volume com água ultrapura.

2.5.2. Solução de limpeza

Em um béquer de 5000 mL pesou-se 50 g de uréia a qual se adicionou 350 mL de água ultrapura, 5 mL de hidróxido de tetrametilamônio 25% e 50 mL de metanol. O pH foi ajustado a 6,5 com ácido acético. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água ultrapura.

2.5.3. Solução de ácido fórmico e Tampão formiato

Pipetou-se 1 mL de ácido fórmico em um balão volumétrico de 1L, completou-se o volume com água ultrapura (solução 0,1%). Transferiu-se 250 mL dessa solução para um béquer ajustando-se o pH a 6,5 com NH_4OH (1 mol).

2.6 Amostra

A amostra de leite fluido controle foi fornecida pela fazenda do Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO) de Pedro Leopoldo-MG. As amostras de 1 L foram, previamente, homogeneizadas e fracionadas em três porções de 50 mL e transferidas para frascos de vidro devidamente identificados e armazenadas em freezer a -18°C .

3. MÉTODOS

O método validado foi baseado no procedimento descrito por CINQUINA et al. (2003). Fundamenta-se na extração dos resíduos de anfenícolis (cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol) com prévia precipitação das proteínas e lipídeos do leite por ultracentrifugação e mistura da camada intermediária com tampão McIlvaine, purificados em cartuchos de extração em fase sólida HLB e eluídos com metanol. Após a purificação, o extrato foi retomado com tampão formiato e acetato de etila e realizada a extração líquido-líquido. A fase orgânica foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplada ao detector de massas (CLAE/EM).

3.1 Extração e purificação

Um volume de 30 mL de leite foi centrifugado a 5.000 g por 99 min. Retirou-se a fase intermediária com auxílio de uma pipeta, transferindo-se 2,5 mL para dois tubos de falcon de 50 mL, adicionando-se em seguida 2,5 mL de tampão de extração (Tampão McIlvaine modificado) e agitando-se por 20 segundos no vórtex. Adaptou-se o cartucho de extração em fase sólida HLB ao sistema de extração a vácuo tipo manifold, e o mesmo foi ativado com 3 mL de metanol e 3 mL água ultrapura. Sob pressão atmosférica, foi transferido para o cartucho o volume total de cada tubo de falcon, descartando-se o eluato. Lavou-se as paredes do tubo com 2 porções de 1 mL da solução de extração e transferiu-se quantitativamente para o cartucho. Foram passadas 2 porções de 1 mL da solução de limpeza e deixou-se sob vácuo por 30 minutos para secar. O resíduo do cartucho foi eluído com 3 mL de metanol em um balão e o extrato obtido foi evaporado em evaporador rotatório (60°C).

Após evaporação, foi lavada a parede do tubo com exatamente 1 mL de tampão formiato de amônio 0,1% (pH 6,5), agitando-se no vórtex até dissolução total do resíduo. Em seguida, adicionou-se 4 mL de acetato de etila e 1 mL álcool isoamílico, agitando-se por mais 30 segundos no vórtex. Após separação das fases, transferiu-se 4 mL do sobrenadante (fase orgânica) para um balão e evaporou-se em evaporador rotatório (60°C) até secar. Retomou-se o resíduo com tampão formiato de amônio e agitou-se no vórtex até completa dissolução. A solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm antes da injeção no CLAE/EM.

Volumes de 30 mL de amostra de leite controle e de água foram submetidos, separadamente, ao mesmo procedimento descrito anteriormente.

3.2. Etapa cromatográfica

Para a separação dos ánfenicóis utilizou-se uma coluna Simpack, C₁₈ 100 mm x 2,0 mm x 5 µm. A fase móvel foi constituída de solução de ácido fórmico 0,1% pH 6,5:metanol (60:40) e o sistema de eluição foi isocrático a uma vazão de 0,2 mL/min., com temperatura do forno de 40°C.; detector LCMS-2010 EV; fonte ionização electrospray, modo Sim negativo m/z 321, 354 e 356, sistema isocrático de eluição,

volume injetado 20 μ L, voltagem 3,0 Kv, temperatura da CDL e Bloco 270°C e fluxo do gás de nebulização.

4. VALIDAÇÃO

Os critérios de desempenho do método foram estabelecidos por procedimento intralaboratoriais com soluções padrão, amostras de leite controle e adicionadas de padrão. Os critérios avaliados foram linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, e limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Os resultados foram avaliados segundo as normas de aceitabilidade de cada teste estatístico empregando um nível de significância de $\alpha=0,05$ (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2002 e 2003; THOMPSON, 2000). A avaliação dos *outliers* foi realizada pelo teste de resíduos padronizados por Jackknife (GRUBBS, 1969, BROWN & FORSYTHE, 1974; DURBIN & WATSON, 1951), a distribuição normal dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner (RYAN & JOINER, 1976), a homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe (HORWITZ, 1995), a independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson (MILLER & MILLER, 1988); e o ajuste ao modelo por análise de variância (ANOVA) (BARROS et al., 2001).

4.1. Seletividade

A seletividade do método foi determinada analisando-se a amostra de leite controle, o branco dos reagentes, a amostra de leite controle adicionada do pool de padrões (cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol) e o pool de padrões (INMETRO, 2003 e SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

4.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada de acordo com SOUZA & JUNQUEIRA (2005). A curva de calibração foi preparada a partir das soluções padrão para obter as concentrações de 0,7; 0,8; 1,0; 2,5; 5,0; 25,0 e 75,0 ng/mL de tianfenicol, 0,7; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 7,0 e 10,0 ng/mL para o cloranfenicol, e de 1,5; 2,0; 2,5; 4,0; 6,0; 8,0 e

10,0 ng/mL para o florfenicol. A curva de calibração foi construída com sete (07) pontos, todos injetados em triplicata.

4.3. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado pelo método de adição, preparando-se no mesmo dia duas curvas: uma da solução padrão dos antibióticos conforme item 4.2 e outra dos extratos da amostra de leite controle obtidos conforme procedimento do item 3.1. Aos extratos da amostra de leite controle foi adicionado 1000 µL da solução de pool de padrões (item 2.4.5.). As concentrações finais da curva dos padrões do efeito matriz foram de: 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 5,0; 7,5 e 10,0 ng/mL para o cloranfenicol, 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 7,0 e 8,0 ng/mL para o florfenicol, e 0,8; 1,0; 2,5; 10,0; 25,0; 50,0 e 75,0 ng/mL para o tianfenicol. Cada nível de concentração foi preparado em triplicata independente e as leituras feitas de forma aleatória. Após a comprovação da normalidade dos resíduos ($\alpha=0,05$), homoscedasticidade das variâncias dos resíduos das curvas pelo teste *F* (DRAPER & SMITH, 1998) e ajuste do modelo, as inclinações e as interseções estimadas para duas curvas foram comparadas pelo teste *t* ($\alpha = 0,05$) variâncias combinadas (SOUZA E JUNQUEIRA, 2005; SNEDECOR & COCHRAN, 1989).

4.4. Exatidão e Precisão

A exatidão e precisão do método do anfenicóis foram realizadas transferindo-se, separadamente, para balões volumétricos de 25 mL, 60, 70, 80, 300, 400, 500 e 750 µL da solução padrão intermediária I do cloranfenicol; 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 e 800 µL da solução padrão intermediária I do florfenicol; e 60 e 80 µL solução padrão intermediária I do tianfenicol e 25 µL, 100 µL, 250 µL, 500 µL e 750 µL da solução intermediária II do tianfenicol. O volume foi completado com o leite controle. A seguir, o conteúdo de todos os balões foi homogeneizado e seguiram-se os procedimentos de extração e purificação (item 3.1.). Todos os níveis de fortificação foram preparados em triplicata e as leituras realizadas aleatoriamente (ISO 5725-1, 1995; ISO 5725-5, 1998; ISSO 17025, 2000). As concentrações finais

corresponderam a 0,6; 0,7; 0,8; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,5 ng/mL para o cloranfenicol, 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 8 ng/mL para o florfenicol, e 0,6; 0,8; 2,5; 10,0; 25,0; 50,0 e 75 ng/mL para o tianfenicol. Avaliou-se a exatidão do método no nível estudado comparando os resultados das porcentagens de recuperação individuais e o resultado médio com os critérios estabelecidos pela EC (2002). Foi realizado o teste de premissa ANOVA, normalidade pelo teste de Ryan-Joiner e homogeneidade de variância pelo teste de Brown-Forsythe. A precisão foi estimada em condições de repetitividade parcial por ANOVA, estabelecidos por THOMPSON (2000); BARRET & LEWIS, (1994); e QUATROCCHI et al. (1992), RYAN & JOINER (1976) e BROWN & FORSYTHE (1974).

4.5. Limite de detecção e quantificação do equipamento

Os limites de detecção (LDE) e quantificação (LQE) do equipamento foram determinados preparando soluções nas concentrações de 0,7; 0,8 e 1,0 ng/mL para o cloranfenicol e tianfenicol, e de 1,5; 2,0 e 2,5 ng/mL para o florfenicol. A seguir foram injetadas no CLAE/EM, nas condições estabelecidas no item 3.3., em triplicata. A curva padrão foi determinada segundo QUATROCCHI et al. (1992) e, com base na equação da reta obtida, determinou-se o valor do coeficiente linear da reta (Y_{bl}). A seguir, determinaram-se as estimativas dos desvios-padrões das replicatas de cada concentração e construiu-se uma curva de concentração x desvio-padrão, e, como no caso anterior, obteve-se o coeficiente linear dessa nova reta (S_{bl}). Os limites foram calculados matematicamente conforme abaixo:

$$LDE = (Y_{bl} + 3 \times S_{bl})/b$$

$$LQE = (Y_{bl} + 10 \times S_{bl})/b$$

Onde:

Y_{bl} = estimativa da resposta na concentração zero

S_{bl} = desvio padrão da resposta na concentração zero

b = inclinação da curva de calibração na faixa de concentração estudada

4.6. Limites de detecção e de quantificação do método

Os limites de detecção e quantificação do método foram estabelecidos a partir dos valores dos limites determinados para o equipamento (LDE e LQE).

Tomando-se, separadamente, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μ L da solução intermediária III de tianfenicol (25 ng/mL); 100, 140, 500; 750 e 1000 μ L da solução intermediária II de florfenicol (25 ng/mL); e 160, 300, 480, 750, 1000 e 1250 μ L solução intermediária II de cloranfenicol (25ng/mL) em balão volumétrico de 25 mL, que teve o volume completado com o leite controle. O preparo e a purificação do extrato seguiram o estabelecido no item 3.1. Todas as concentrações foram preparadas em triplicata e as leituras realizadas em ordem aleatória. Os extratos foram injetados no cromatógrafo (item 3.3.), e através dos dados foram avaliados os limites de detecção, como sendo a menor concentração que produziu uma razão S/R (sinal/ruído) ≥ 3 . O limite de quantificação foi considerado o dobro do limite de detecção (NATA, 1997).

4.7. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) foram calculados segundo as equações propostas por VAN LOCO & BEERNAERT (2003) e pela ISO 11843-1 (1997) e ISO 11843-2 (2000), utilizando os resultados dos ensaios de precisão e exatidão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada qualitativamente pela inspeção visual do perfil cromatográfico e dos espectros de massas da amostra de leite controle, dos reagentes, dos padrões em solvente e da amostra adicionada de padrões. Quando se comparou a resposta da amostra de leite controle (branco) em relação à resposta obtida para os padrões em solvente, não foi observada a presença de compostos com tempo de retenção e de relação m/z iguais a do tianfenicol ($T_r=3,00$; m/z=354 e

356), do florfenicol (TR=4,00; m/z=356) e do cloranfenicol (Tr=7,00 min; m/z=321) (Figuras 1a e 1b).

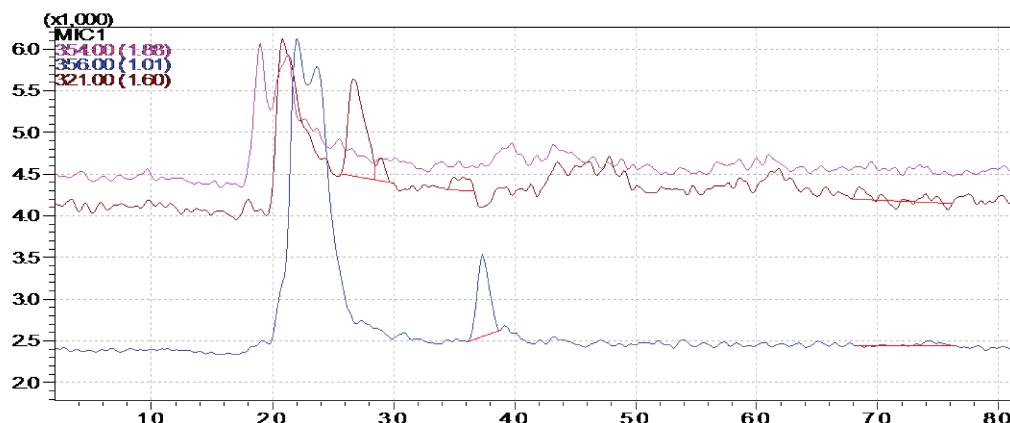


Figura 1a: Perfil cromatográfico das amostras em do branco de leite controle. Modo Sim negativo.

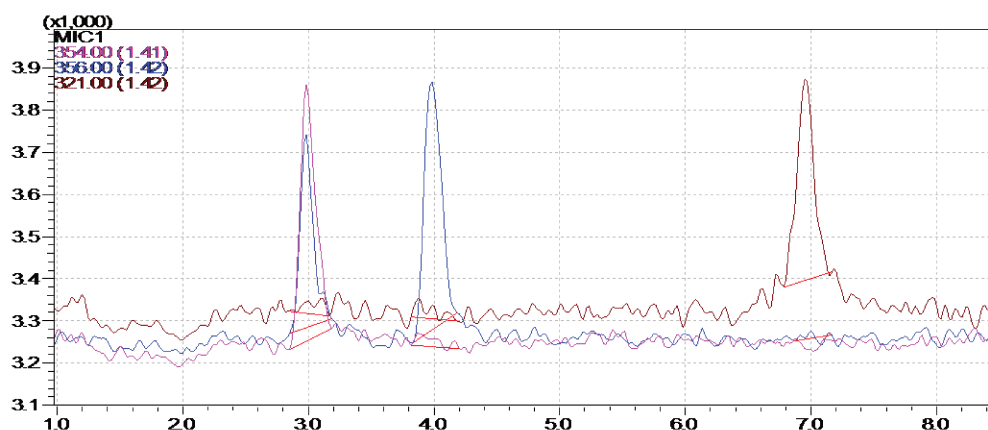


Figura 1b: Perfil cromatográfico do pool de padrão de tianfenicol (TR=3,0; m/z=354), florfenicol (TR=4,0; m/z=356) e cloranfenicol (TR=7,0; m/z=32). Modo Sim negativo.

No perfil cromatográfico (**Figura 2a**) observa-se a ausência, tanto no leite controle e no branco dos reagentes, dos picos relacionados aos antibióticos aqui estudados, diferente do perfil cromatográfico da amostra de leite controle (branco) adicionada dos antibióticos (**Figura 2b**). Nesta **Figura 2b**, observou-se dois picos com o mesmo tempo de retenção do tianfenicol (Tr=3,0 min), sendo que um deles

apresentou a mesma razão m/z do florfenicol ($m/z=356$). Essa interferência só foi observada em concentrações mais altas.

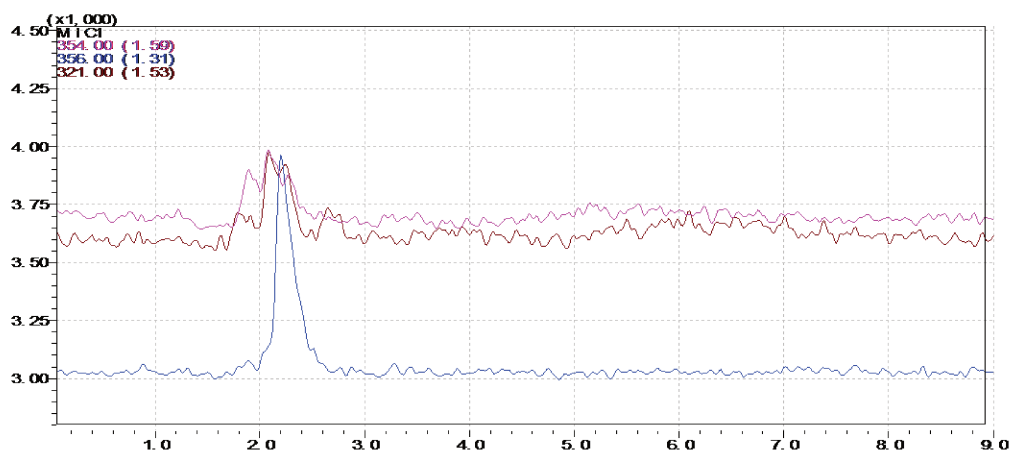


Figura 2a: Perfil cromatográfico do branco e dos reagentes Modo Sim negativo.

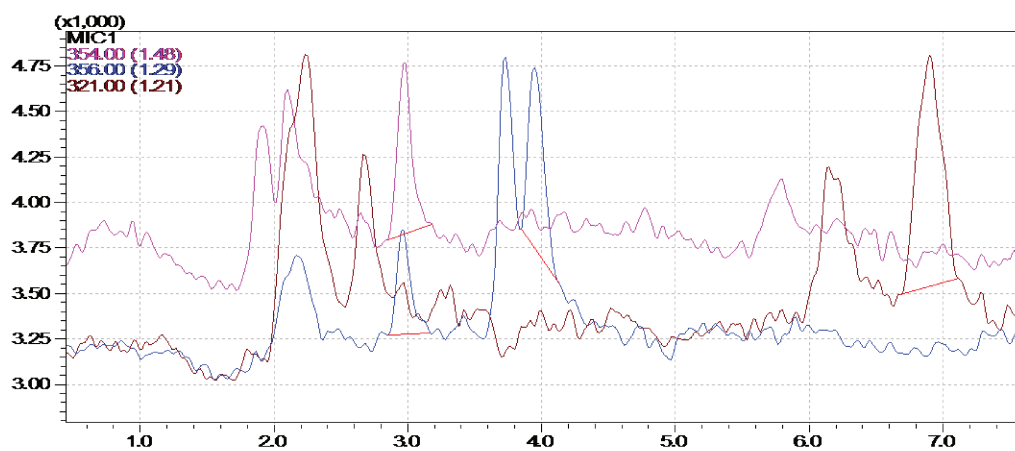


Figura 2b: Perfil cromatográfico das amostras em branco adicionada do pool de padrão de tianfenicol ($m/z=354$, $Tr=3,0$) florfenicol ($m/z=356$; $Tr=4,0$) e cloranfenicol ($m/z=321$; $Tr=7,0$).

A **Figura 3** mostra o espectro de massas dos anfenicois e no **Anexo 3** foram registrados os espectros de massas e o cromatograma individual dos mesmos.

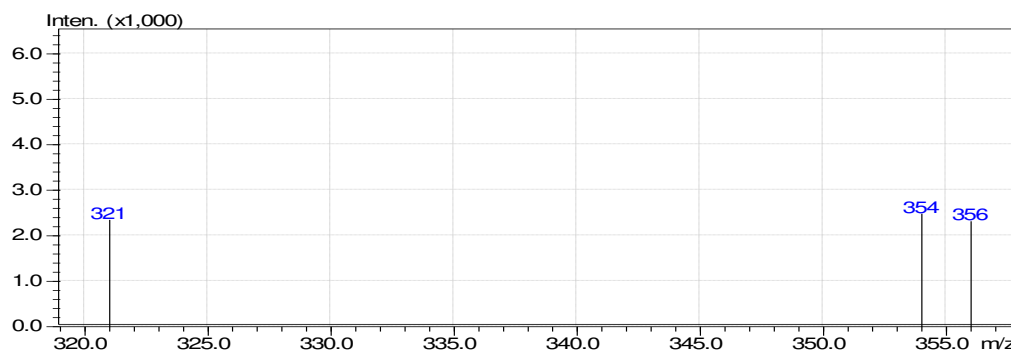


Figura 3: Espectro de massas dos padrões de anfenicóis tianfenicol (m/z=354) florfenicol (m/z=356) e cloranfenicol (m/z=321).

5.2. Linearidade e Efeito Matriz

A avaliação da linearidade consistiu na análise de cada variável selecionada através de testes apropriados, visando verificar se as especificações do modelo proposto adaptavam-se de forma concisa aos dados observados. O grau de ajuste do modelo foi avaliado através do cálculo do coeficiente de correlação (r) e do coeficiente de correlação ajustado (MEYER & ZUND, 1993). Relatos da literatura mostram que a regressão linear pode ser muito sensível à presença de pontos *outliers* (valores fora da curva) e/ou *leverages* (valores extremos). Segundo SOUZA & JUNQUEIRA (2005), valores extremos em uma curva de calibração sugerem que possam pertencer a uma população diferente ou serem resultados de um erro de medição. Valores extremos detectados entre os níveis de confiança de 95% e 99% são considerados *stragglers*, enquanto os detectados a níveis de maiores que 99 % são *outliers* (BURKE, 2001). Os valores extremos (*outliers*) dos pontos das curvas de calibração, dos padrões em solventes e da matriz leite adicionada de padrões, foram avaliados pelo método dos resíduos padronizados de Jackknife (J_{ei}). Os resíduos padronizados de Jackknife (J_{ei}) seguem a distribuição de t ($1 - \alpha/2$; $n - p - 1$), sendo retirados os pontos que apresentaram valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico (t_{vc}). Os valores de J_{ei} para a curva de calibração do tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol em solvente foram de 2,145, 2,201 e 2,110, enquanto o valor de t crítico

(t_{vc}) foi de 2,131, 2,179 e 2,101, respectivamente. Já para a curva de calibração da matriz adicionada de antibióticos o J_{ei} foram de 2,179, 2,201 e 2,145, e o t_{vc} de 2,160, 2179 e 2,131, para o tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol, respectivamente (**Figuras 4, 5 e 6**). Pode-se, então, concluir que os valores extremos foram mais detectados nas curvas do efeito matriz do que nas do padrão em solvente.

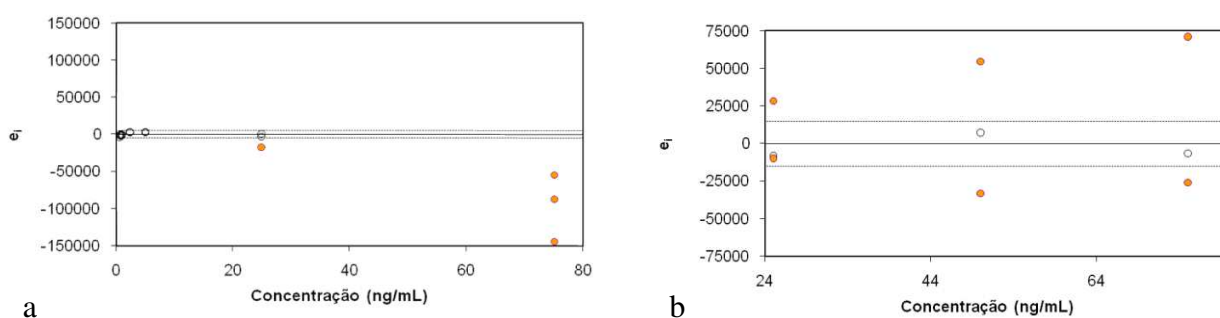


Figura 4: Gráficos de resíduos do tianfenicol em solvente (a) e do efeito matriz (b).

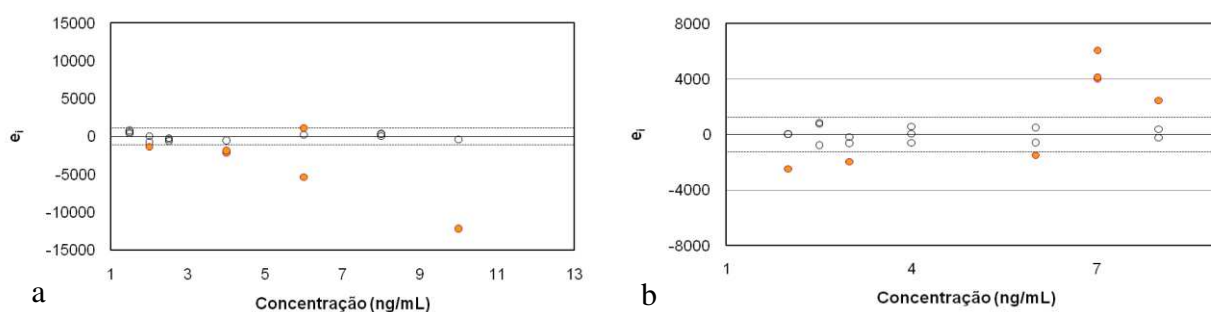


Figura 5: Gráficos de resíduos do florfenicol em solvente (a) e do efeito matriz (b).

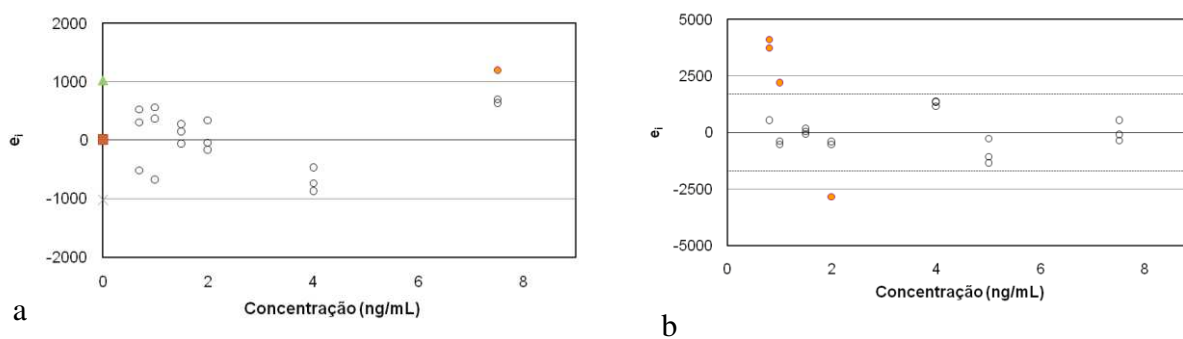


Figura 6: Gráficos de resíduos do cloranfenicol em solvente (a) e do efeito matriz (b).

Entretanto, as exclusões dos valores extremos de resíduos permaneceram dentro de 22% do número original de resultados (BELSLEY, et al., 1980 e HORWITZ, 1995). Os gráficos de probabilidade normal (Q-Q) obtidos para as curvas do florfenicol, cloranfenicol e tianfenicol em solvente e do efeito matriz encontram-se ilustrados nas **Figuras 7, 8, e 9**.

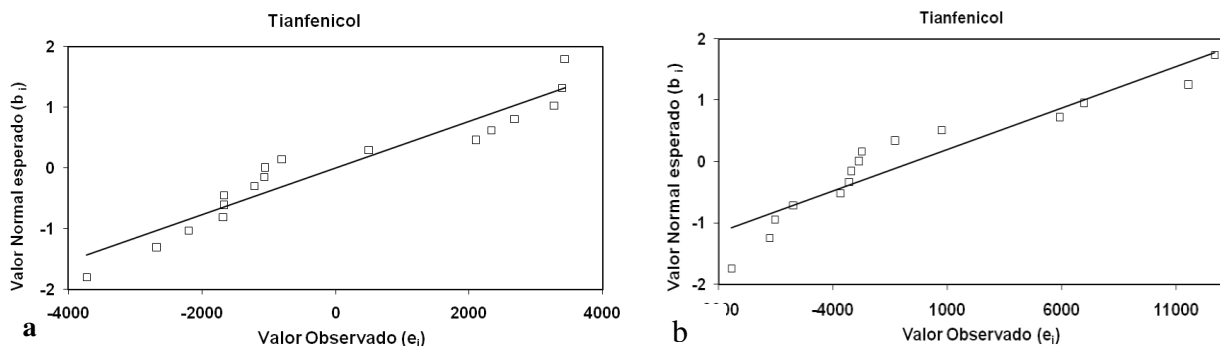


Figura 7: Gráficos de distribuição Q-Q tianfenicol em solvente (a) e no efeito matriz

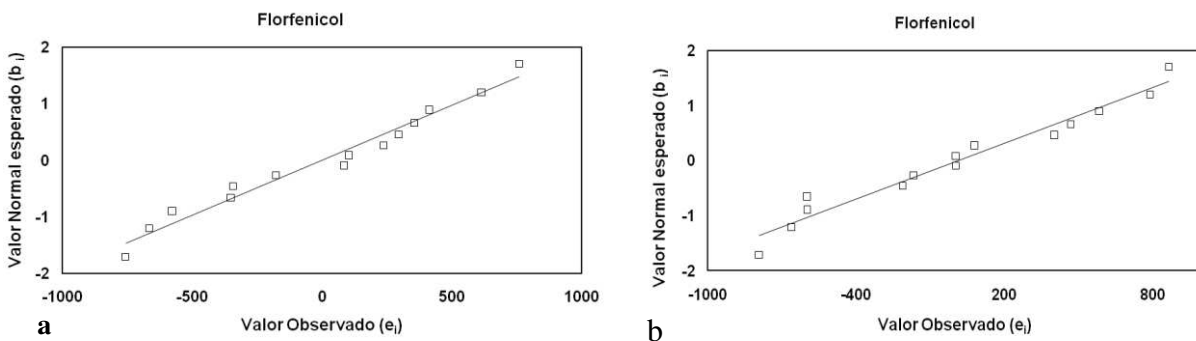


Figura 8: Gráficos de distribuição Q-Q florfenicol em solvente (a) e no efeito matriz (b).

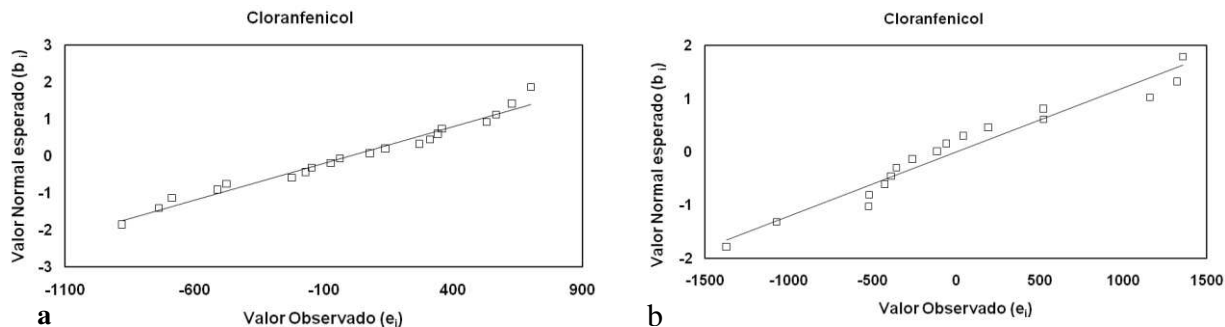


Figura 9: Gráficos de distribuição Q-Q-cloranfenicol em solvente (a) e no efeito matriz (b).

A premissa de que os resíduos das curvas de calibração dos padrões em solvente e do efeito matriz seguem a distribuição normal foi confirmada pelo cálculo dos coeficientes de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}), que foram maiores do que os valores de $R_{crítico}$ (R_c).

Os valores de (R_{vc}) para as curvas dos padrões tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol em solvente foram de 0,9538, 0,9847 e 0,9849 e do (R_c) a 0,9437, 0,9351, 0,9503, respectivamente. Para o efeito matriz, os valores de (R_{vc}) corresponderam a 0,9404; 0,9800 e 0,9757 e do (R_c) 0,9383 0,9351 e 0,943, respectivamente para os padrões de tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol.

Os resultados evidenciaram que o desvio da normalidade não foi significativo para $p > 0,05$ para curvas de calibração dos padrões e efeito matriz. A independência entre os resíduos das curvas de calibração do tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol em solvente e do efeito matriz foi avaliada pelo teste estatístico de Durbin-Watson (d). Os resultados mostraram uma distribuição homogênea dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos para os níveis de concentrações de ambas as curvas de calibração. Os valores calculados de d para os padrões e efeito matriz dos do tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol foram de 0,543, 1,478 e 2,119 e 0,641, 2,447 e 1,082, respectivamente, permanecendo dentro do critério de aceitabilidade $0 \rightarrow 2 \leftarrow 4$ (**Figura 10**).

Os dados estatísticos apresentados na **Tabela 1** mostram os resultados do teste de Levene (t_{Lc}), utilizado para confirmar a variabilidade dos resíduos da regressão para as curvas de calibração do tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol em solvente e no efeito da matriz. Esses revelaram que os valores de (t_{Lc}) foram menores que os valores tabelados ($t_{0,975}$), ao nível de 95% de confiança. Concluiu-se que a variação entre os resíduos em cada nível de concentração, nas duas curvas de calibração não foi significativa, mostrando-se constante e homoscedástica (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974).

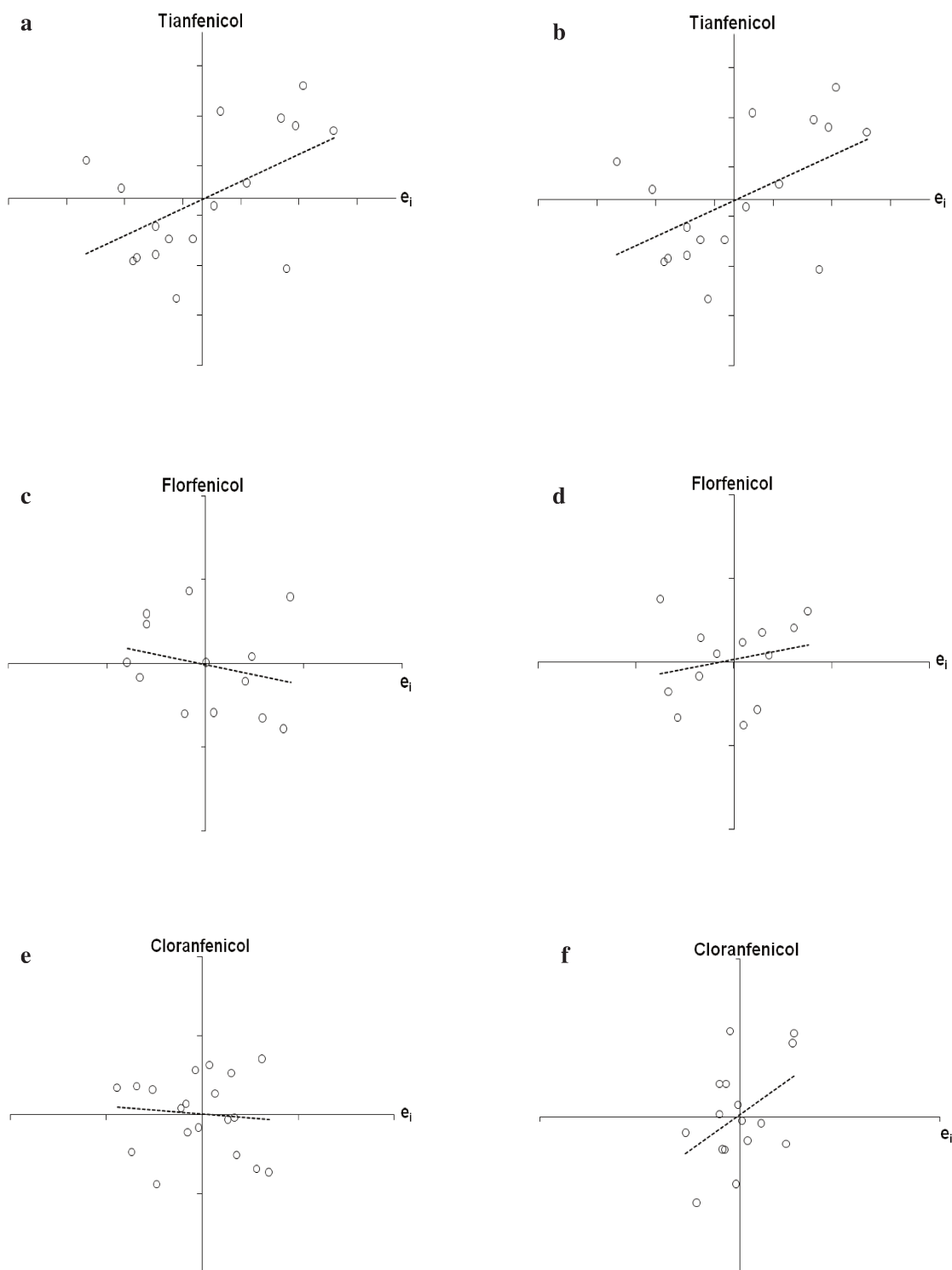


Figura 10: Gráfico de Durbin-Watson para a curva de calibração e o efeito matriz do tianfenicol (a) e (b) florfenicol (c) e (d) e cloranfenicol (e) e (f) em solvente

Tabela 1: Avaliação da homoscedasticidade dos resíduos das curvas de calibração dos padrões em solvente e efeito matriz pelo teste estatístico de Levene modificado.

Padrões de Antibióticos	Parâmetros Estatísticos das Curvas de Calibração							
	Padrões em Solvente				Efeito Matriz			
	N	S ²	t _L	t _{0,975}	N	S ²	t _L	t _{0,975}
Tianfenicol	17	2,71x 10 ⁶	0,540	2,131	15	1,86x 10 ⁷	1,956	2,160
Florfenicol	14	6,91 x 10 ⁴	1,229	2,179	14	9,89x 10 ⁴	0,904	2,179
Cloranfenicol	30	6,84 x 10 ⁴	1,103	2,101	17	2,35x 10 ⁵	1,927	2,131

N-número de observações; S²-variância dos níveis de concentração; t_L-t estatístico de Levene; t_{0,975} – t de Levene a um nível de significância p> 0,05

A avaliação do modelo de regressão linear foi realizada pela análise de variância (ANOVA). Os valores dos coeficientes de regressão linear (r²) da curva de calibração do tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol em solvente foram de 0,9985, 0,9992 e 0,9996, respectivamente, evidenciando a sua adequacidade e a possibilidade de estimativas confiáveis(**Figura 11**).

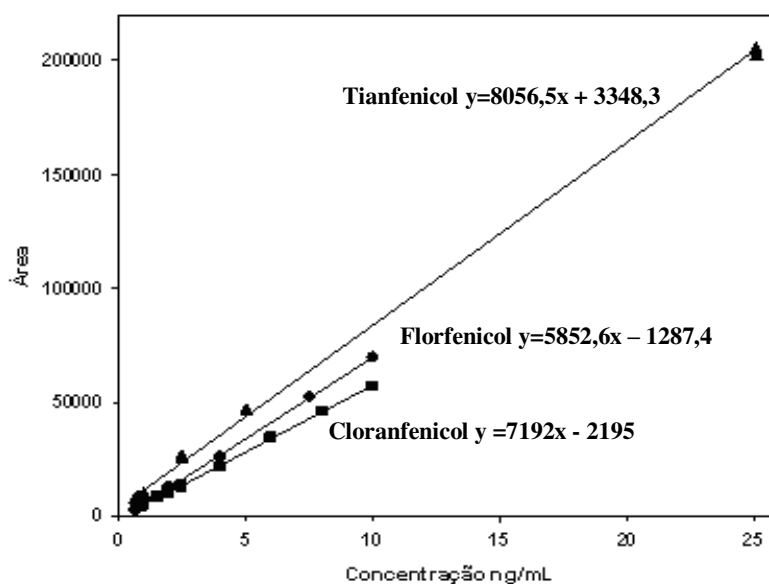


Figura 11: Curva de calibração do tianfenicol, florfenicol e cloranfenicol

A significância da regressão linear e a falta de ajuste foram avaliadas pelo teste estatístico de F para as curvas dos padrões de antibióticos em solvente e efeito matriz. Os resultados mostraram que o valor de F_{cal} foi maior que o $F_{critico}$ ($p > 0,05$), indicando a existência de uma relação linear entre as variáveis x e y para ambas as curvas de calibração. Os cálculos estatísticos para a falta de ajuste da curva de calibração dos antibióticos em solvente revelaram que F_{cal} foi maior que o $F_{critico}$ ($p \geq 0,05$), exceto para o tianfenicol. No entanto, a falta de ajuste nas curvas de calibração do florfenicol e o cloranfenicol não foi significativa, visto que não alterou a relação linear entre as variáveis x e y nos níveis de concentração estabelecido.

Os testes estatísticos confirmaram a validade da regressão para uma concentração de 0,70 a 10 ng/mL de tianfenicol, de 1,50 a 10,0 ng/mL para o florfenicol, de 0,70 a 10 ng/mL para o cloranfenicol, indicando a faixa linear da curva. O intercepto não foi significativamente diferente de zero ($p > 0,05$) para a curva padrão com solvente. O teste de F para a falta de ajuste mostrou que $F_{cal} < F_{tab}$ evidenciando que o desvio de linearidade para a curva de calibração do efeito matriz não foi significativo para $p > 0,05$ (**Tabela 2**).

Tabela 2: Estatística da regressão ANOVA incluindo o teste de ajuste para as curva de calibração dos padrões de antibióticos em solventes e efeito matriz.

Padrões de Antibióticos	Fontes de Variância Estatística para as Curvas de Calibração							
	Padrões em Solventes				Efeito Matriz			
	Regressão		Falta de Ajuste		Regressão		Falta de Ajuste	
	F_{cal}	F_{tab}	F_{cal}	F_{tab}	F_{cal}	F_{tab}	F_{cal}	F_{tab}
Tianfenicol	$10,56 \times 10^{-3}$	$F_{(1,10)}$	1,99	$F_{(5,10)}$	$19,28 \times 10^{-3}$	$F_{(1,14)}$	1,59	$F_{(5,14)}$
		4,96		3,33		4,60		2,96
Florfenicol	$16,39 \times 10^{-3}$	$F_{(1,7)}$	5,76	$F_{(5,7)}$	$15,17 \times 10^{-2}$	$F_{(1,13)}$	1,39	$F_{(5,13)}$
		5,59		3,97		4,67		3,03
Cloranfenicol	$47,65 \times 10^{-3}$	$F_{(1,13)}$	3,49	$F_{(5,13)}$	$8,426 \times 10^{-3}$	$F_{(1,16)}$	1,99	$F_{(5,16)}$
		4,67		3,07		4,49		2,85

O teste de t com variâncias combinadas foi adotado para comparar os

parâmetros de interseção e inclinação para avaliação do efeito matriz uma vez que a variância dos resíduos nas duas curvas de calibração quando comparadas foram consideradas homogêneas pelo teste F ($p > 0,05$). Os resultados apresentados **Tabela 3** mostraram que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a curva de calibração do efeito matriz do cloranfenicol e a curva padrão do cloranfenicol em solvente visto que o $t_{cal} < t_{tab}$, portanto pode-se inferir que suas inclinações e intercepto são iguais. Para o tianfenicol e florfenicol, o $t_{cal} > t_{tab}$ mostrou que suas inclinações e intercepto são diferentes ($p > 0,05$), portanto existe diferença significativa entre as curvas de calibração do efeito matriz do tianfenicol e florfenicol e desses padrões em solventes. Através da comparação da curva de calibração dos padrões adicionados aos extratos da matriz em relação à curva de calibração em solventes, pode-se verificar que ocorreu um efeito aditivo para o tianfenicol a partir da concentração de 50ng/25 μ L e multiplicativo para o florfenicol (**Figuras 12a, b e c**). Enquanto para o cloranfenicol não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Os valores dos coeficientes de regressão linear para curva de calibração dos extratos da matriz de leite adicionados dos padrões de antibióticos pesquisados estão relacionados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Estimativas dos parâmetros estatísticos da curva de calibração dos extratos da matriz leite adicionados de padrões

Padrões de Antibióticos	Equação da Reta	Coeficiente correlação (r^2)	Valor de t_{cal} inclinação	Valor de t_{cal} intercepto	Valor de t'_{tab}
Tianfenicol	$y=11795x-5104,3$	0,9993	4,6163	2,6235	2,045
Florfenicol	$y=2967,6x-7494,3$	0,9922	39,6727	16,413	2,048
Cloranfenicol	$y=7673,2x-1179,5$	0,9982	0,5100	2,0259	2,035

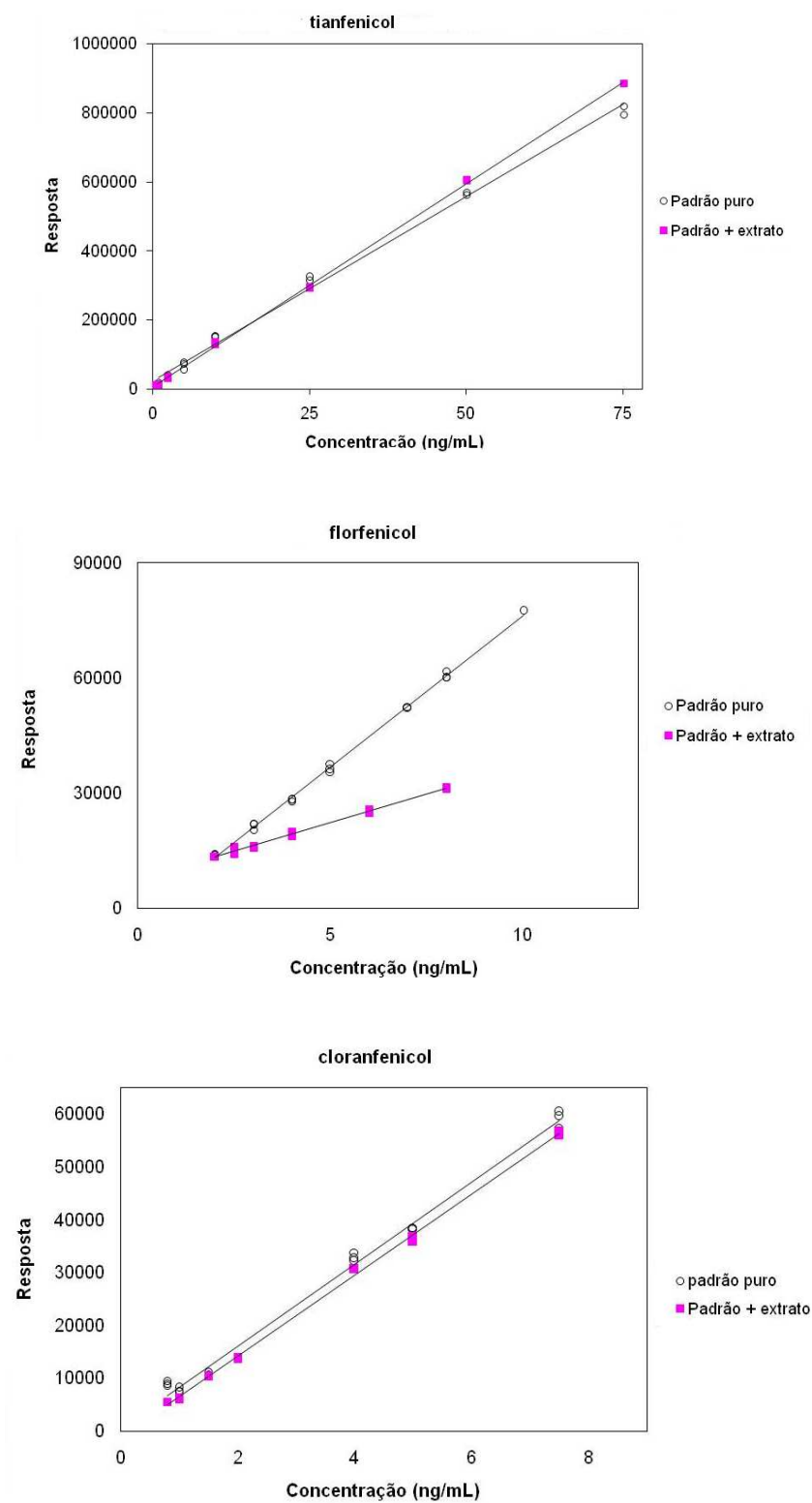


Figura 12: Curva de calibração dos padrões de antibióticos em solvente e na matriz leite.

5.3. Exatidão e Precisão

Os resultados de recuperação média (**Tabela 4**) para as faixas de concentração de 0,3 a 50 µg/L de tianfenicol, de 0,5 a 4,0µg/L de florfenicol e de 0,5 a 4,0µg/L de cloranfenicol foram de 90,67% a 131,36%, de 77,12% a 104,27% e de 74,12% a 100,84%, respectivamente. Pode-se concluir que a recuperação média obtida encontra-se dentro da faixa de aceitabilidade recomendada pelo Codex Alimentarius, que é de 70% a 110% (EC, 2003), evidenciando a exatidão do método.

A avaliação da precisão da metodologia e da repetibilidade do equipamento, feitas através do teste estatístico de Grubs, mostrou que tanto o método como o equipamento foram precisos nas faixas de concentração estudada. Os valores calculados, 1,34 para o método e 2,03 para o equipamento, foram inferiores aos valores críticos de Grubs ($p > 0,05$). Considerando a massa relativa do analito e a complexidade da matriz, o valor do coeficiente de variação evidenciou a precisão do método, com níveis dentro da faixa recomendada de 15% a 30% (HORWITZ, 1995).

Tabela 4: Percentual médio de recuperação (Rm%) dos anfenicóis.

Tianfenicol								
Conc. (µg/L)	0,3	0,3	1,25	5,0	12,5	25	37,5	50,0
Rm%	108,22	90,67	96,53	131,36	118,70	111,95	101,43	77,12
Cv%	8,74	3,59	2,37	0,06	5,58	0,12	4,37	2,54
Florfenicol								
Conc. (µg/L)	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0
Rm%	104,27	97,69	96,067	96,756	83,13	96,27	88,71	77,12
Cv%	6,54	1,78	6,32	1,36	3,62	5,57	5,64	2,20
Cloranfenicol								
Conc. (µg/L)	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	2,5	3,75	4,0
Rm%	83,11	84,19	93,18	100,84	80,57	86,13	82,74	74,12
Cv%	9,12	6,52	15,01	6,30	2,47	4,57	0,56	3,34

CV- coeficiente de variação

5.4. Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método

Os limites de detecção e de quantificação do equipamento e do método, estabelecidos para o florfenicol, tianfenicol e cloranfenicol estão apresentados na **Tabela 5**. De acordo com o preconizado pela EC (2002), substâncias com limite de tolerância zero, como o tianfenicol, florfenicol e clorofenicol no Brasil, considera-se o limite de detecção do método. Para o clorofenicol a EC (2003) estabelece um limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) de 0,3µg/L.

Tabela 5: Limites de detecção e quantificação calculados.

antibióticos	equipamento		método	
	LDE µg/L	LQE µg/L	LDM µg/L	LQM µg/L
florfenicol	0,0223	0,0757	0,20	0,75
tianfenicol	0,05905	0,100	0,10	0,20
clorofenicol	0,0770	0,156	0,30	0,75

5.5 Limites de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$) do Método

Os limites de decisão ($CC\alpha$) e de capacidade de detecção ($CC\beta$) para o cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol foram estimados conforme estabelecido pela ISO 11843-2 (1997) e ISSO 17025 (2000) e VAN LOCO & BEERNAERT (2003), utilizando os dados obtidos nos ensaios de precisão (EC, 2002). Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para tianfenicol foram de 52,68 e 55,67 µg/L, para o florfenicol foram de 0,42 e 0,63 µg/L e para o cloranfenicol de 0,26 e 0,32 µg/L, respectivamente.

A literatura apresenta várias formas de interpretação dos resultados dos limites de decisão ($CC\alpha$) e de capacidade de detecção ($CC\beta$), conforme mencionado

por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Uma baseia-se na relação sinal/ruído, somente considerando o controle de resultados falsos positivos (erro tipo α), o que leva a uma probabilidade de resultados falsos negativos (erro tipo β) de 50%. A outra se baseia em testes de hipóteses, considerando valores independentes para os dois tipos de erro. Em concordância com esta última, ANTIGNAC et al. (2003) estabeleceram que, com resultados menores que os valores encontrados de $CC\alpha$, as amostras devem ser declaradas como conformes ou com analitos em concentrações inferiores ao limite máximo estabelecido, com um nível de confiança de $1-\alpha$. Para os resultados maiores ou iguais aos valores estimados para $CC\beta$, as amostras devem ser declaradas como não conformes ou com analitos em concentrações superiores ao limite máximo estabelecido, com um nível de confiança de $1-\beta$.

6. CONCLUSÕES

O método de análise para a determinação de anfenicóis desenvolvido e validado para a matriz leite, empregando cartucho de extração em fase sólida para purificação e posterior separação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas, com ionização por eletrospray, apresentou precisão, exatidão, repetitividade, linearidade, limites de detecção e quantificação adequados ao uso pretendido.

7- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- ANDERSON, C., R. RUPP, H.S., Wu, W. Complexities intetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, 1075:23-32, 2005.
- ANTIGNAC, J. P., LE BIZEC, B., MONTEAU, F., ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application. **Analytical Chimia Acta**, v. 483, n. 1, p. 325334, 2003.
- BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity**. New York: Wiley, 1980. 292 p.

- BOVANOVÁ, L.; BRANDSTETEROVÁ, E. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 880, p. 149-168, 2000.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253 de 16 de setembro de 2003. Instituiu Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos de Origem Animal–PAMVet **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 set. 2003.
- BRITO, M.A.V., PORTUGAL, J.A., DINIZ, F.H., FONSECA, P.R., ANGELO, F.F., PORTO, M.A.C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. In: MARTINS, C.E., FONSECA, P.C., BERNARDO, W.F., CÓSER, A.C., FRANCO, P.R.V., PORTUGAL, J.A.B., CARVALHO, F.S. (Ed.) **Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para produção de leite em bases sustentáveis**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 19-32.
- BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. **LC CG**, p. 19-24, 2001.
- CEE. Comunidade Econômica Européia. **Aprova o Regulamento Técnico nº 2372/90 do Conselho das Comunidades Européias**. Estabelece os limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal, 26 de junho de 1990, 66p.
- CINQUINA, A.L, LONGO, F., ANASTASI, G., GIANNETI, L, COZZANI R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal Chromatography A**, 987:227-233, 2003.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling - (FAO/WHO). **Single-laboratory validation. Consideration of harmonized IUPAC guidelines for the in-house validation of methods of analysis**. CX/MAS 02/10. 2002.

- CODEX ALIMENTARIUS. Commission on Methods of Analysis and Sampling **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**, CX/MAS 95/3, 1995.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/web/jecfa.jsp>>. Acesso em: 28 de agosto de 2008.
- CORREGE, I., LACOSTE, A., MORCHE, N., DUVAL, D. Comparison of rapid detection methods for antibacterial residues in pork meat. *Techni-Porc*, April 17, p. 29-37, 1994. In: BOULAIRE, L.E.S.; JEAN-CLAUDE, B., FRANCOIS, A. Veterinary drug residues survey en meta: an HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2134-2142, 1997.
- CEE. European Economic Community. Regulamento da Comunidade Económica Européia nº 2377/90 do Conselho de 26 de junho de 1990. Prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. **Official Journal of the European Communities**, 1990, R 2377, p. 1-119.
- DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Wiley. 1998. 706 p.
- DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression. **Biometrika**, v. 38, n. 1-2, p.159-178, 1951.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 2002, L 221/8.
- EC. (European Commission) Commission decision 2003/181/EC of 30 January 2003; **Official Journal Europe Communication**, 2003, L30, 50.
- EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998. 61 p.
- GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969.

- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Applied. Chemistry.**, v. 67, n. 2, p. 331343, 1995.
- ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of analytical procedures: methodology.** Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8p.
- INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia**, 2^a ed., 2000.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 35 p.
- ISO (International Standards Organização). **ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.** Geneva:ISO, 1994, 42 p.
- ISO (International Standards Organização). **ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method.**Geneva:ISO, 1994, 1998, 56p.
- ISO (International Standard Organization). **ISO 11843-1.Capability of detection – Part 1: Terms and definitions.** Geneva: ISO, 1997. 10p.
- ISO (International Standard Organization). **ISO 11843-2.Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case.** Geneva: ISO, 2000, 24 p.
- ISO (International Standard Organization). **ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.** Geneva: ISO, 2005. 28 p.
- ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005. 28 p.
- LEITE, F.**Validação em Análise Química**, 4^a ed., Editora Átomo: Campinas, 2002.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; Hoeffding, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) **Contributions to**

- probability and statistics.** Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.
- MARTINS, H.A.J.; BUSTILLOS, O.V.; PIREA, M.A.F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “Tandem”. **Quimica Nova**, vol. 29, nº 3, 586-592, 2006.
- MEYER, P.C.; ZUND, R.E. **Statistical methods in analytical chemistry.** New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- MILLER, J.C.; MILLER, J.N.; **Statistics for Analytical Chemistry**, 2^a ed., Ellis Horwood: Chichester, 1988.
- NATA (National Association of Testing Authorities-Australia). Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sydney, 1997. 8 p.
- OKA, H., ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal Chromatography A**, v.882, p. 109-133, 2000.
- PALERMO, J.N., Fatos sobre legislação e uso de antibióticos como aditivos em rações. www.gabeira.com.br. Acessado em 13/10/08.
- PEZZA, L.; ÀNGEL; NOZA, L.; ARCE, VALCÁRCEL, M. Simultaneous determination of chloroamphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in bovine milk by micellar electrokinetic chromatography. **Química Nova**, v.29, n.5, 2006.
- QUATROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC: aplicación y práctica.** Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, 1992. p. 301.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. *et al.* Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v.27, n. 5, p.771-780, 2004.
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality.** The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for the pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements for the US Food and drug administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization **Journal Chromatography A**, v. 987, p. 57–66, 2003.

- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- SORENSEN, L.K.; RASMUSSEN, B.M.; BOISON, J.O.; KENG, L. Simultaneous determination of six penicillins in cows raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, B**, v. 694, p. 383-391, 1997.
- SORENSEN, L.K.; SNOR, L.K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 145-151, 2000.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G.A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytical Chimia Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.
- TARBIN, J.A. FARRINGTON, W.H.H. SHEARER, G. Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations: I Determination of benzylpenicillin in milk by reverse phase liquid chromatography with solid phase extraction and LC fractionation clean-up. **Analytical Chimia Acta** v. 318, p. 95, 1995.
- THOMPSON, M.; Recente trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency. **Analyst**, v. 125, p. 535-552, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.78, n. 5, p. 143-196, 2006.
- VAN LOCO, J.; BEERNAERT, H. In: PROCEEDINGS OF EUROPEAN FOOD CHEMISTRY, 12, 2003, Brugges, Belgium. Proceedings... Brugges: **European Food Chemistry**, 2003. p. 9194.
- VANOVERMEIRE, I. et al. Interpretation of CALUX results in view of the EU maximal TEQ level in milk. **Talanta**, v. 63, n. 5, p. 1241-1247.

CAPÍTULO 3

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL – IDENTIFICAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β - LACTÂMICOS EM LEITES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL – IDENTIFICAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS β - LACTÂMICOS EM LEITES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA* Helena Teixeira GODOY**

*Fundação Ezequiel Dias / Instituto Octávio Magalhães / Divisão de Vigilância Sanitária / Serviço de Química - Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira – 30510-010, Belo Horizonte-MG – Brasil.

**Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – 13083-970, Campinas-SP – Brasil.

RESUMO: Esta pesquisa descreve a validação intralaboratorial de um procedimento por cromatografia líquida de alta eficiência combinado a espectrometria de massas (CLAE/EM) para confirmar a presença e identificação de resíduos de treze antibióticos da classe dos β -lactâmicos, as penicilinas (amoxilina, oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina, ampicilina, penicilinas V e G) e as cefalosporinas (cefoperazone, cefapirina, cefotaxim, cefalotin e cefazolin). O procedimento analítico consistiu na extração líquido-líquido dos antibióticos com acetonitrila. Após centrifugação, o sobrenadante foi evaporado e solubilizado com tampão formiato de amônio, pH 6,5. O extrato foi purificado em Centricom® 30.000 e injetado no cromatógrafo. As condições de análise na CLAE/EM consistiram da separação em coluna XTerra Waters® C₁₈, 150 x 4,6mm x 3,5 μ m, sistema isocrático de eluição com acetonitrila: ácido fórmico 0,1% (70:30), fonte de ionização eletrospray, modo SIM positivo e negativo, voltagem de 1,5 kV, temperatura da CDL e do bloco 250°C e fluxo do gás de nebulização de 1,5 L/min. Os critérios de validação estudados para identificação do analito foram a seletividade e limite de detecção, compreendendo dois delineamentos experimentais, ensaios com padrões para determinar as características de identificação do analito e ensaios com padrões, amostras brancas e fortificadas para verificação da seletividade e do limite de detecção. O resultado do processo de validação mostrou que o método foi aplicável para confirmação de resíduos dos treze antibióticos da classe dos β -lactâmicos nas matrizes leite integral UHT e em pó.

Palavras-chave: leite, antibióticos, β -lactâmicos, validação, cromatografia, espectrometria de massas.

ABSTRACT: This research describes the intralaboratorial validation of a procedure by high performance liquid chromatography coupled with spectrometry mass (HPLC/MS) to confirm the presence and identification of residues of thirteen antibiotics of the β -lactams class, the penicillins (amoxillin, oxacillin, dicloxacillin, cloxacillin, ampicillin, penicillins V and G and the cephalosporins (cephoperazone, cephapirin, cephotaxim, cephalothin and cephazolin). The analytical procedure consisted a liquid-liquid extraction of antibiotics with acetonitrile. After centrifugation, the sobrenatant was evaporated and solubilized in ammonium formate buffer, pH 6,5. The extract was purified in Centricom® 30.000. The analysis conditions in HPLC/MS consisted of the separation in XTerra Waters® C18 column, 150 x 4,6mm x 3.5 μ m, isocratic elution system with acetonitrile: formic acid 0,1% (70:30), source of ionization eletrospray, selective ion monitoring mode (SIM), positive and negative, voltage of 1,5 kV, CDL and the block temperature 250°C and flow of the nebulization gas of 1,5 L/min. The validation parameters studied for analyte identification were the selectivity and detection limit, in two experimental design: test with standards to determine the characteristics of the analyte identification and test with standards, samples without and addition the standards for verification of the selectivity and of the detection limit. The result of the validation process showed that the method was applicable for confirmation of the thirteen antibiotics residues of the β -lactams in UHT and powdered milk.

Keywords: milk, validation, antibiotics, β -lactams, chromatography, spectrometry mass

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos da classe dos β -lactâmicos são formados pelo grupo das penicilinas, como a amoxilina, oxacilina dicloxacilina, cloxacilina, ampicilina, penicilinas V e G, e pelo grupo das cefalosporinas, como o cefoperazone, cefapirina, cefotaxim, cefalotin, cefazolin e ceftiofur, que são utilizados tanto na medicina veterinária como na humana.

O uso de antimicrobianos quer como medida terapêutica ou profilática quer como promotores de crescimento, segundo PALERMO (2001), torna-se mandatário; porém, deve ser realizado de forma correta e cauteloso. Caso contrário, podem levar à presença de resíduos desses antibióticos nos alimentos, especialmente se não forem observadas as boas práticas de aplicação. Considerando a prevenção dos problemas de saúde, os órgãos reguladores têm fixado os limites máximos de resíduos (LMR) ou, então, proibido o emprego de alguns.

Muito pouco se sabe a respeito de resíduos de penicilinas e cefalosporinas em leites integrais UHT e em pó comercializados no Brasil. Esses antibióticos são provavelmente os mais utilizados na medicina veterinária no tratamento de infecções bacterianas. Na maioria das plataformas de recebimento de leite, o ensaio de triagem mais simples é realizado por diversos Kits baseados em teste microbiológicos, físico-químicos e/ou imunoenzimáticos, disponíveis no mercado para a pesquisa de resíduos de antibióticos. Segundo RAMIREZ et al. (2001), cada tipo de Kit possui suas vantagens e desvantagens em relação ao custo, tempo de resposta e especificidade. Segundo CROSBY (1991), MOATS & ROMANOWSKI (1998) e MITCHELL (1998), um resultado positivo obtido em qualquer um desses kits fornece pouca ou nenhuma informação a respeito da identidade do resíduo do antibiótico presente.

A utilização de técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência tem permitido a separação e quantificação dos resíduos de antibióticos que aliada recentemente à espectrofotometria de massas com analisadores triploquadrupolo, Íon Trap ou QT vem amenizando os efeitos dos interferentes

provenientes principalmente dos componentes da matriz (ALI et al., 2000; CHERLET et al., 2000; CORCIA & NAZZARI, 2003 e OFFLER & TERNES, 2003, BOGIALLI et al., 2004).

É sabido que, o monitoramento está ligado à disponibilidade de procedimentos analíticos validados que permitam a determinação de resíduos de antibióticos de forma adequada e acurada. Esse fato, aliado à segurança alimentar leva ao desenvolvimento e à validação da metodologia analítica para sua análise simultânea.

Esta pesquisa descreve o desenvolvimento e validação do procedimento analítico para identificar resíduo de β -lactâmicos em leite UHT e em pó por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em detector de massas simples quadrupolo.

2. MATERIAIS

2.1. Reagentes, solventes e materiais diversos

Foram utilizados os seguintes padrões de antibióticos: cefalotim sódico (Fluka Lote 22241, pureza 99%), cefapirina sódica (Sigma Lote 112K0485, 94,9%), cefazolim sódico (Fluka Lote 22127, 98%), cefoperazone sódico (Sigma Lote 073K1281, 93,7%), ceftiofur (Pharmacia Lote 001/02, 93,7%), cefotaxim (Fluka Lote 22128-5G), amoxicilina (Materia-prima Sem lote), ampicilina (Fluka Lote 10044-5G), penicilina V (Riedel-de-Haen Lote 46616), penicilina G (Sigma Lote 455901/1), cloxacilina (Fluka Lote 27555), dicloxacilina (Sigma.Lote D9016-5G) e oxacilina (Sigma.Lote 28221-5G). Os reagentes de uso comum em laboratório foram de grau analítico e os solventes para a cromatografia de grau cromatográfico, além de água ultrapura obtida no sistema Milli-Q (Millipore®).

As amostras foram filtradas em cartuchos Millex- PVDL (Millipore®) de 0,45 μ m e a fase móvel em filtros PVDL de 0,45 μ m e 47 mm de diâmetro (Millipore®). O cartucho de extração em fase sólida utilizado na limpeza do extrato das amostras foi o Centricon® 30.000 (Millipore).

2.2. Vidraria

Foram utilizadas vidrarias com certificado da Rede Brasileira de Metrologia e as de uso comum do laboratório.

2.3. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica, vórtex, manifold, centrífuga modelo CR22G (Hitachi), evaporadora rotativa (Joan), ultra-purificador de água Milli-Q (Millipore), ultra-som e um cromatógrafo a líquido modelo Class Vp (Shimadzu), composto de sistema desgaseificador a hélio, duas bombas, injetor automático de 1 a 50 μL de capacidade, forno para coluna, coletor de frações e detectores, dispostos em série, de arranjo de diodos e de massas com fonte de ionização por *eletrospray* e simples quadrupolo, modelo LCMS-210A (Shimadzu). O sistema foi monitorado por um software, que também auxiliou na aquisição e no tratamento de dados.

2.4. Preparo dos Padrões

2.4.1. Solução padrão estoque dos β -lactâmicos

As soluções estoques dos padrões de antibióticos foram preparadas pesando separadamente em balança analítica 10 mg de amoxilina, oxacilina dicloxacilina, cloxacilina, ampicilina, penicilinas V e G, cefapirina, ceftiofur, cefazolin, cefalotin, cefoperazone e cefotaxim. Os padrões foram dissolvidos em água ultrapura e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual se adicionou 2 mL de metanol grau cromatográfico, completando-se o volume com água ultrapura. A concentração resultante foi de 1,0 mg/mL. As soluções foram estocadas em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.2. Solução padrão intermediária I de β -lactâmicos

Pipetou-se separadamente 100 μL de cada solução padrão estoque (1,0 mg/mL) de β -lactâmicos, utilizando pipeta automática, em um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 2 mL de metanol grau cromatográfico, completando-se o volume com água ultrapura. A concentração desta solução foi de 10 $\mu\text{g/mL}$. As

soluções foram estocadas em freezer a -18°C .

2.4.3. Solução padrão intermediária II de β -lactâmicos

Pipetou-se separadamente 500 μL de cada solução padrão intermediária I de β -lactâmicos (10 $\mu\text{g/mL}$), utilizando pipeta automática de 10–1000 μL para um balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol grau cromatográfico e completou-se o volume com água ultrapura. Homogeneizou-se e transferiu-se para frascos. Guardou-se em freezer a -18°C . A concentração desta solução foi de 1 $\mu\text{g/mL}$.

2.4.4. Pool de padrões de β -lactâmicos A (fortificação das amostras antes da extração)

Pipetou-se 27,8; 27,8; 278; 16,70; 11,10; 13,9; 13,9; 13,9; e 13,9 mL das soluções padrão estoque de 1 mg/mL de ampicilina, amoxicilina, penicilina G, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur de e 560; 560; 560; e 560 mL das soluções intermediárias I de 10 $\mu\text{L/mL}$ de cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina e penicilina V, respectivamente, para um balão volumétrico de 10mL, utilizando pipeta automática. Foram adicionadas 2 mL de metanol grau cromatográfico e completou-se o volume com água ultrapura. As soluções foram mantidas em freezer a -18°C . A concentração final de ampicilina, amoxicilina, penicilina G, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone, ceftiofur, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina e penicilina V corresponderam a 2,78; 2,78; 27,80; 1,67; 1,11; 1,39; 1,39; 1,39; 1,39; 0,56; 0,56; 0,56 e 0,56 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

2.4.5. Pool de padrões de β -lactâmicos B (fortificação das amostras depois da extração)-Efeito matriz

Pipetou-se 1000; 1000; 300; 300; 300; 300; 600; 400: 500; 500; 500 e 500 μL da solução padrão intermediária I (10 $\mu\text{g/mL}$) de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur e 100 μL da solução padrão estoque de penicilina G de 1 mg/mL, utilizando pipeta automática para um balão de 25 mL. Completou-se o volume com tampão formiato de amônio 0,1% pH=6,5. As soluções foram mantidas em freezer a -18°C . A concentração final de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina,

dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone, ceftiofur e penicilina G corresponderam a 1,00; 1,00; 0,30; 0,30; 0,30; 0,30; 0,60; 0,40; 0,50; 0,50; 0,50; 0,50 e 10,0 µg/mL, respectivamente.

2.4.6. Pool de padrões de β-lactâmicos C (limite de detecção do equipamento)

Foi pipetado 300 µL da solução padrão intermediária II (1 µg/mL) de cefapirina, de ceftiofur, de oxacilina, de cloxacilina e de penicilina V, 200 µL da solução padrão intermediária I (10 µg/mL) de ampicilina e amoxicilina, 350 µL cefalotin, 300 µL cefoperazone, 250 µL cefazolin e 80 µL da solução padrão estoque de penicilina G (1 mg/mL) para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com solução tampão formiato de amônio 0,1% pH 6,5. As soluções foram mantidas em freezer a -18°C. As concentrações finais das soluções de cefapirina, ceftiofur, oxacilina, cloxacilina e penicilina V foram de 30 ng/mL, de ampicilina e amoxicilina 200 ng/mL, de cefalotin 350 ng/mL, de cefoperazone 300 ng/mL, de cefazolin 250 ng/mL e de penicilina G 8µg/mL.

2.4.7. Pool de padrões de β-lactâmicos D (limite de detecção do método)

Utilizando pipeta automática, pipetou-se 500; 500; 75; 150; 75; 75; 75; 875; 625; 125; 750 e 75 µL da solução padrão intermediária I (10 µg/mL) de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur, respectivamente, de e 223 µL da solução padrão estoque (1 mg/mL) de penicilina G, para um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 2 mL de metanol grau cromatográfico e completou-se o volume com água ultrapura. As soluções foram guardadas em freezer a -18°C. A concentração final de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone, ceftiofur e penicilina G correspondeu a 0,500; 0,500; 0,075; 0,150; 0,075; 0,075; 0,075; 0,875; 0,625; 0,0125; 0,75; 0,075; e 20,00 µg/mL, respectivamente.

2.5. Preparo da amostra de leite fluido controle

A amostra de leite controle foi fornecida pela fazenda do Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(LANAGRO) de Pedro Leopoldo-MG. As amostras (aproximadamente 1L) foram previamente homogeneizadas e fracionada em três porções de aproximadamente 50mL, transferidas para frascos de vidro e armazenadas em freezer a -18°C.

3. MÉTODOS

O método estabelecido no laboratório foi baseado nos procedimentos descritos por BLANCHFLOWER et al. (1994); ANG et al. (1996), ITO et al. (1998); VERDON & COUEDOR (2000); BRUNO et al. (2001a e b); CORCIA & NAZZARI (2002); GHIDINI et al. (2003) e BOGIALLI et al. (2004). O procedimento de extração dos resíduos de β -lactâmicos das amostras de leite foi feito com a adição de acetonitrila ao leite seguido de centrifugação. O sobrenadante foi evaporado e retomado com tampão formiato pH 6,5 e filtrado no Centricon® 30.000 para separação das proteínas. O eluato foi separado e identificado por CLAE com detecção em espectrômetro de massas simples quadrupolo no modo positivo e modo negativo.

3.1 Extração e purificação da amostra de leite controle

Pipetou-se 1 mL do leite controle para um tubo de centrífuga e adicionou 15 mL de acetonitrila. Esta solução foi centrifugada a 5.000 g por 30 minutos a 0 °C. Transferiu-se quantitativamente o sobrenadante para um tubo de falcon de 50 mL e evaporou-se até secura na evaporadora rotativa à 55°C. Retomou-se o resíduo com 1000 μ L de tampão formiato de amônio pH 6,5 e agitou-se em vórtex até completa dissolução. Transferiu-se para o Centricon® 30.000 e centrifugou-se por 90 minutos a 5.000 g. Pipetou-se 180 μ L do sobrenadante para um vial de vidro de fundo cônico e adicionou-se 20 μ L da solução de hidróxido de amônio 0,1% (pH final deve ser aproximadamente 8). A seguir foi injetado no cromatógrafo 80 μ L da amostra. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.2. Condições analíticas para CLAE/EM dos β -lactâmicos

Para a etapa cromatográfica, utilizou-se coluna XTerra® C18 ,150 x 4,6mm x

3.5 μm e fase móvel composta por acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (30:70). O sistema de eluição foi isocrático, a uma vazão 0,3 mL/min. e temperatura de 45°C. As condições do detector de massas foram estabelecidas com 1.5 kv de voltagem, temperatura CDL e do Bloco 250°C e fluxo do gás de nebulização 1,5L/min. Os picos foram monitorados no modo SIM positivo (ampicilina $m/z=350$; amoxicilina $m/z=350$, 365 e 366; penicilina G $m/z=335$; cefapirina $m/z=424$; cefotaxim $m/z=456$ e 455; cefazolin $m/z=455$ e 456; cefalotin $m/z=414$; ceftiofur: $m/z=524$ e 525; cefoperazone $m/z=646$) e no modo SIM negativo (penicilina $m/z=349$; oxacilina $m/z=400$ e 468; cloxacilina $m/z=434$; dicloxacilina $m/z=468$) nas mesmas condições analíticas, exceto a proporção de fase móvel que foi 50:50.

4. VALIDAÇÃO

Os critérios de desempenho estudados para identificação dos β -lactâmicos foram a seletividade e o limite de detecção do método. Foram realizados ensaios com padrões, amostras de leite controle (branco) e amostras fortificadas. Os resultados foram avaliados segundo as regras de aceitabilidade de cada teste estatístico, empregando nível de significância de $\alpha=0,05$ (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; EC, 2002; CODEX ALIMENTARIUS, 1997).

4.1. Seletividade

A seletividade do método foi determinada analisando-se amostras controle (branco), o branco dos reagentes e dos padrões e amostra de leite fortificado com a adição dos padrões de amoxilina, oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina, ampicilina, penicilina V e G, cefoperazone, cefapirina, cefotaxim, cefalotin, cefazolin e ceftiofur para se verificar a existência ou não de substâncias interferentes na região dos picos dos analitos (INMETRO, 2003 e SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Os dois níveis de fortificação das amostras ficaram na faixa de 10,09 ng/mL a 500,40 ng/mL. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

4.2. Limite de detecção do equipamento

O limite de detecção do equipamento foi determinado pipetando diferentes volumes do pool da solução padrão de β -lactâmicos **C** e adicionando-se a estes 160 μ L de tampão formiato e 20 μ L de hidróxido de amônio. As soluções foram injetadas no CLAE/EM no modo SIM positivo e negativo conforme as condições analíticas estabelecidas. O limite de detecção do equipamento foi considerado, para cada antibiótico, como a menor concentração que resultou num pico com três vezes a amplitude do ruído (3S/R).

4.3. Limite de Detecção do Método

Foi pipetado 1 mL de leite controle para um tubo de centrifuga de 40 mL e adicionou-se a esse diferentes volumes (μ L) do pool da solução padrão de β -lactâmicos **D**. Adicionou-se 15 mL de acetonitrila e seguiu-se o procedimento de extração. As concentrações injetadas corresponderam a uma faixa de 1,008 ng/mL a 401 ng/mL de β -lactâmicos no leite. Injetou-se no CLAE/EM no modo SIM positivo e negativo conforme condições analíticas. O limite de detecção do método foi considerado, para cada antibiótico, como a menor concentração que resultou num pico com três vezes a amplitude do ruído (3S/R).

Determinado o limite do método, foi realizada a fortificação no nível determinado por sete vezes, na tentativa de se observar a repetitividade do limite de detecção do método.

4.4. Estudo do efeito matriz

Pipetou-se 1 mL de leite controle (branco) para o tubo de centrífuga de 40 mL e adicionou-se 15 mL de acetonitrila e seguiu-se o procedimento de extração até obtenção dos extratos das amostras. Pipetou-se 160 μ L dos extratos para um vial de vidro de fundo cônico ao qual foi adicionado 20 μ L do pool da solução padrão de β -lactâmico **B**, que corresponde aos LDM para cada antibiótico, agitou-se em vórtex por 20 segundos e adicionou-se 20 μ L de hidróxido de amônio 0,1% (pH final deve ser aproximadamente 8). A seguir o extrato foi injetado no cromatógrafo (CLAE/EM)

no modo SIM positivo e negativo, nas condições analíticas estabelecidas. O ensaio foi realizado sete vezes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seletividade

A seletividade do método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por massas (CLAE/EM) para os antibióticos β -lactâmicos foi avaliada qualitativamente pela inspeção visual do perfil cromatográfico e dos espectros de massas da amostra do leite controle (branco), dos reagentes e padrões em solvente e da amostra fortificada.

Devido às características físicas e químicas dos antibióticos β -lactâmicos, alguns foram ionizados no modo SIM positivo, como cefapirina, ceftiofur, cefazolin, cefalotin, cefoperazone, cefotaxim, amoxilina, ampicilina e penicilina G e outros no modo SIM negativo, como oxacilina dicloxacilina, cloxacilina, penicilinas V). Na **Tabela 1** estão relacionados os tempos de retenção e a relação de massa carga dos antibióticos β -lactâmicos analisados neste trabalho. Quando se comparou a resposta da amostra de leite controle (branco) em relação à resposta obtida para os padrões em solvente e branco de reagente, não foi observada a presença de compostos de relação m/z e de tempo de retenção iguais aos da cefapirina, ceftiofur, cefazolin, cefalotin, cefoperazone, cefotaxim, amoxilina, ampicilina, penicilina G, oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e penicilinas V (**Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9**).

Tabela 1: Tempos de retenção (TR) e a relação de massa/carga (m/z) dos antibióticos β -lactâmicos.

Antibiótico	Modo SIM Positivo		Modo Sim Negativo	
	TR	m/z	TR	m/z
Amoxilina	7,75	350(principal, 465 e 366		
Cefapirina	7,86	424	-	-
Cefotaxim	8,36	456 (principal) e 455	-	-
Penicilina G	8,76	335		
Cefazolin	8,87	455 (principal) e 456	-	-
Ampicilina	10,26	350	-	-

Cefoperrazone	10,44	646	-	-
Ceftiofur	15,00	524 (principal) e 525	-	-
Cefalotin	15,14	414	-	-
Penicilina V	-	-	10,13	349 e 434
Cloxacilina	-	-	12,19	434
Oxacilina	-	-	10.82	400 e 468
Dicloxacilina	-	-	14.40	468

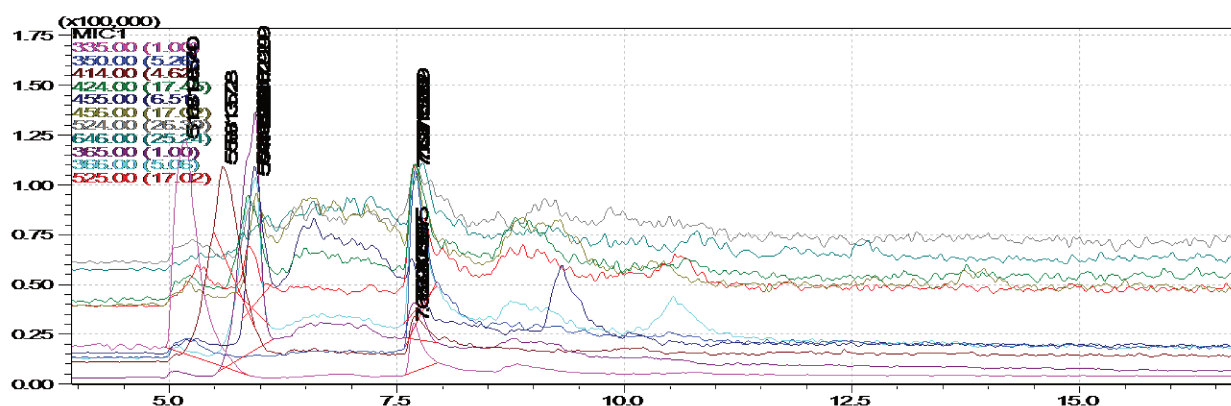


Figura 1: Perfil cromatográfico da amostra de leite controle no modo Sim positivo.

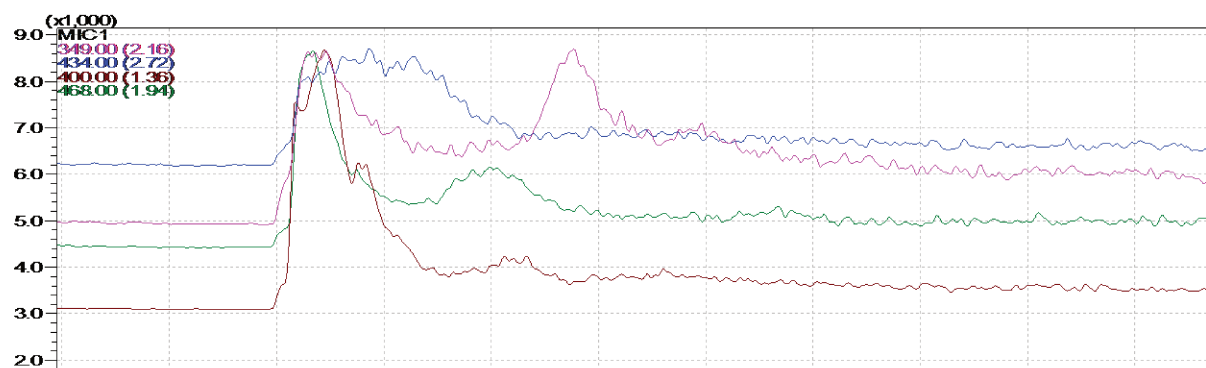


Figura 2: Perfil cromatográfico da amostra de leite controle no modo Sim negativo.

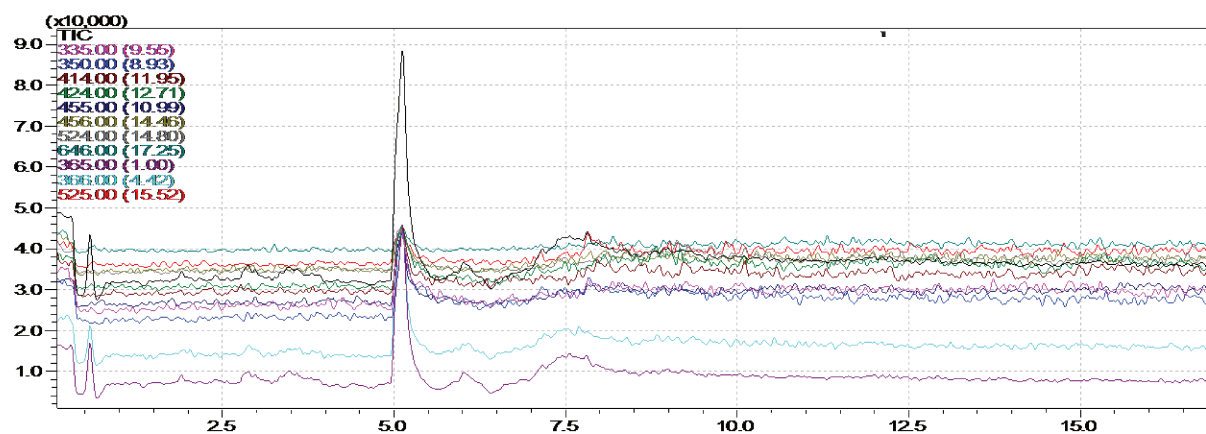


Figura 3: Perfil cromatográfico do branco de reagente no modo sim positivo.

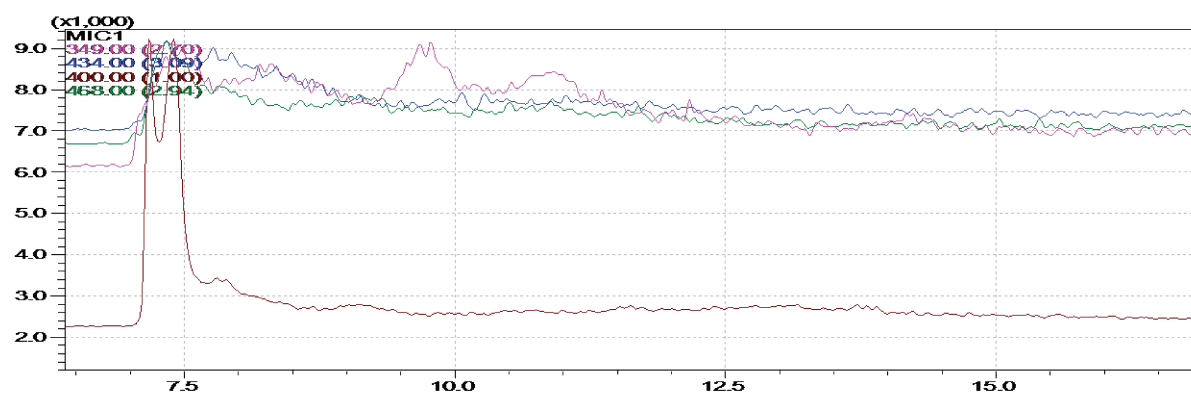


Figura 4: Perfil cromatográfico do branco de reagente no modo sim negativo.

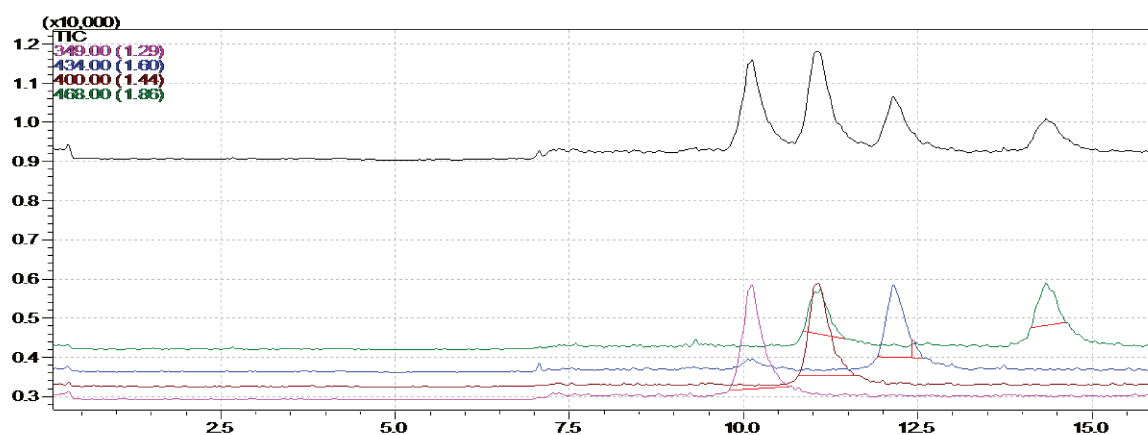


Figura 5: Perfil cromatográfico do pool de padrões de penicilinas no modo Sim negativo
 penicilina V (TR=10,13; m/z=349), oxacilina (TR=11,09; m/z=400 e 468),
 cloxacilina (TR=12,19; m/z=434), dicloxacilina (TR=14.4, m/z=468).

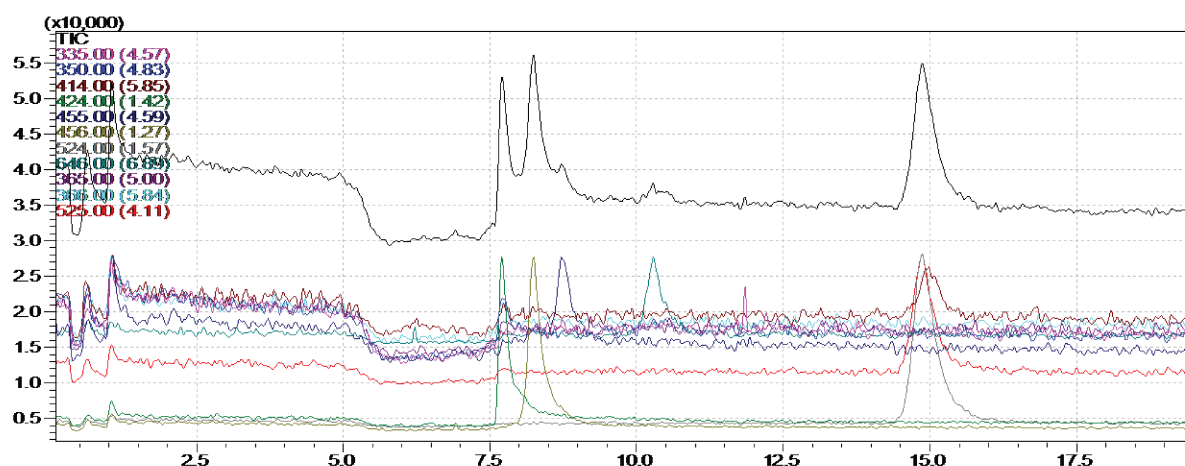


Figura 6: Perfil cromatográfico pool de padrões de cefalosporinas no modo Sim positivo cefapirina (TR=7,86; m/z=424), cefotaxim (TR=8,36; m/z=456), cefazolim (TR=8,87; m/z=455), cefoperazone (TR=10,44; m/z=646), ceftiofur (TR=15,00; m/z=455) cefoperazone (TR=10,44; m/z=646), ceftiofur (TR=15,00; m/z=455 e 456) cefalotin (TR=15,13; m/z=414).

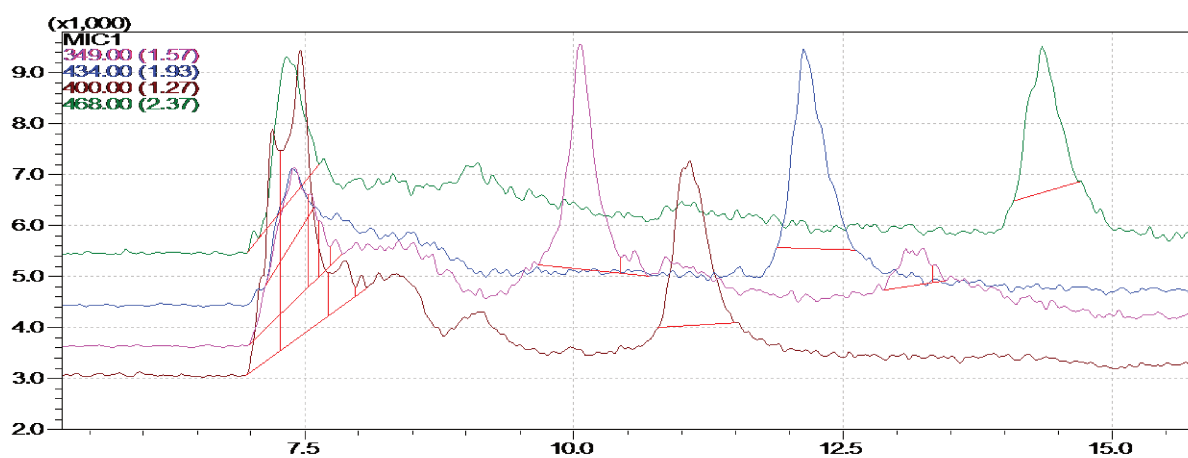


Figura 7: Perfil cromatográfico de amostra em branco adicionada do pool de padrões de penicilinas no modo Sim negativo penicilina V (TR=10,13; m/z=349), oxacilina (TR=11,09; m/z=400 e 468), cloxacilina (TR=12,19; m/z=434), dicloxacilina (TR=14.4,

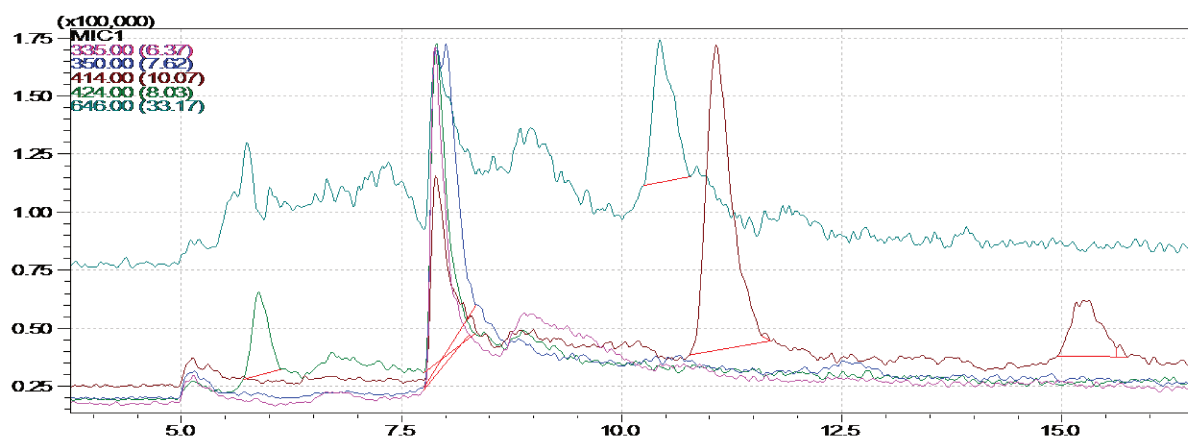


Figura 8: Perfil cromatográfico de amostra adicionada do pool de padrões de cefalosporina e de penicilina no modo Sim positivo **cefapirina** (TR=7,86; m/z=424), **cefoperazone** (TR=10,44; m/z=646), **cefalotin** (TR=15,15; m/z=414), **ampicilina** (TR=10,26; m/z=350), **penicilina G** (TR=8,76; m/z=335;).

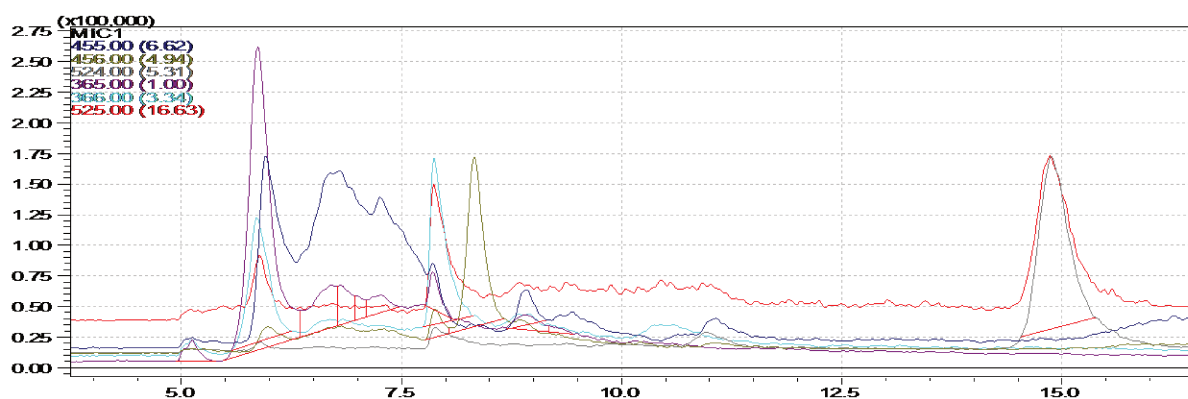


Figura 9: Perfil cromatográfico de amostra de leite controle adicionado de pool de padrões de cefalosporinas e penicilinas no modo Sim positivo **cefotaxim** (TR=8,36;m/z=456), **cefazolim** (TR= 8,87; m/z=455;), **ceftiofur** (Tr=15,00; m/z=455 e 456;), **cefoperazone** (TR=10,44; m/z =646), **amoxicilina** (TR=7,85 m/z=350, 365 e 366).

No **Anexo I** estão apresentados separadamente os perfis cromatográficos da amostra controle para cada razão m/z, mostrando a ausência de compostos interferentes nos tempos de retenção dos antibióticos.

5.2. Limite de Detecção do Equipamento e do Método

O limite de detecção do equipamento correspondeu às seguintes massas

injetadas: 0,24 ng para cefapirina, ceftiofur, oxacilina, cloxacilina e penicilina V; 0,48 ng para dicloxacilina; 1,60 ng para ampicilina e amoxicilina; 2,8 ng para cefalotin; 2,4 ng para cefoperazone; 2,0 ng para cefazolin e 64 ng para penicilina G. Os limites de detecção determinados foram para oxacilina (1,50 µg/L), dicloxacilina (3,00 µg/L), cloxacilina (1,50 µg/L), penicilina V (1,50 µg/L), cefapirina (1,50 µg/L), ceftiofur (1,50 µg/L), cefazolin (12,50 µg/L), cefalotin (17,50 µg/L), cefoperazone (15,00 µg/L) e cefotaxim (2,50 µg/L). Para a amoxicilina (10,00 µg/L), ampicilina (10,00 µg/L) e penicilina G (400,00 µg/L) os limites de detecção do método foram superiores aos limites máximos de resíduo permitidos pela legislação (4,00 µg/L), dessa forma os β-lactâmicos foram identificados de acordo com o limite de detecção do método.

As penicilinas são compostos termolábeis devido à presença de cadeia volumosa ligada ao núcleo do ácido 6-aminopenicilâmico (FAGERQUIST & LIGHTFIELD, 2003). A presença do anel de quatro membros na estrutura dos β-lactâmicos tornam esses compostos mais susceptíveis à degradação por aquecimento e na presença de álcoois. Devido a essas características, o pH e a temperatura devem ser bem controlados durante a sua extração da matriz para evitar sua degradação (HOLSTEGE et al 2002). Isto talvez justifique os altos limites de detecção determinados para alguns dos antibióticos β-lactâmicos neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

Os critérios de desempenho do método aqui utilizados indicaram sua adequação para as análises qualitativa e confirmatória de resíduos de cloxacilina, oxacilina dicloxacilina, penicilina V, cefapirina, ceftiofur, cefazolin, cefalotin, cefoperazone e cefotaxim, exceto para penicilina G, amoxicilina e ampicilina. A quantidade de ensaios realizados em termos do analito, matriz e níveis de concentração avaliados permitiu a aplicabilidade e confiabilidade do procedimento proposto.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- ALI, M.S., SUN, T., MCLEROY, G.E., PHILLIPPO, E.T., **Journal AOAC Analytical Chemistry International** 83 (2000) 39.
- ANG, C.Y.; LUO, W.; HANSEN, E.B.; FREEMAN, J.P.Jr.; THOMPSON, H.C.Jr. Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with precolumn formaldehyde liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization. **Journal of AOAC International**, v. 79, n. 2, p. 389-396, 1996.
- BALIZS, G., HEWITT, A., **Analytical Chimia Acta**, 492,105, 2003.
- BLANCHFLOWER, W.J., HEWITT, S.A, KENNEDY, D.G. **Analyst**, 119, 1994.
- BOGIALLI, S., CAPITOLINO, V., CURINI, R., DI CORCIA A., NAZZARI, M., SERGI, M. Simple and Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for Determining Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Tissues and Milk. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 52, 3286–3291, 2004.
- BRUNO, F. URINI, R. DI CORCIA, A., NAZZARI, M., SAMPERI, R. Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples. **Rapid Communications Mass Spectrom.**15, p.1391–1400, 2001a.
- BRUNO, F.,CURINI, R., DI CORCIA, A.,NAZZARI, M., SAMPERI, R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of β -lactam antibiotics in bovine milk. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 49, p., 3463–3470, 2001b.
- CHERLET, M. S., DE BAERE, S., CROUBELS S., DE BACKER P., **J. Chromatogr. B** 742 , 283.**Journal Chromatography A** 880, p. 85, 2000.
- CINQUINA, A.L.; LONGO, F.; ANASRASI, G.; GIANNETTI, L.; COZZANI, R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal of Chromatography A**, n. 987, p. 227-233, 2003.
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Comission . Commission on **Methods**

- of Analysis and Sampling; Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes, CX/MAS 95/3, 1995.**
- CROSBY, N.T. Determination of Veterinary Residues in Food, Ellis Horwood Series in **Food Science and Technology**, London, UK, 1991.
- CORCIA, D. A., NAZZARI, M., Liquid chromatography-mass spectrometry methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. **Journal Chromatography A**, 974, p. 53–89, 2002.
- EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 2002, L 221/8.
- FAGERQUIST, C.K., LIGHTFIELD, A.R., LEHOTAY, S.J. Confirmatory and quantitative analysis of b-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 1473-1482, 2005.
- GHIDINI, S., ZANARDI, E., VARISCO, G., CHIZZOLINI, R. Residues of beta-lactam antibiotics in bovine milk: confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry after microbial assay screening. **Food Additive Contaminante**. 20 528–34p. 2003
- HOLSTEGE, D.M., PUSCHNER, B., WHITEHEAD, G., GALEY, F.D., **Journal Agricultural.Food Chemistry**. 50, 406p, 2002.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 35p.
- ITO, Y., IKAI, Y., OKA H., MATSUMOTO, H., KAGAMI, T., TAKEBA, K. J. MITCHEL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; McEWEN, S. A. et al. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Tests Performance. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.
- MITCHELL, J.M.; GRIFFTTHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and performance. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 6, p.

- 742-756, 1998.
- MOATS, W.A. ROMANOWSKI, R.D. Determination of penicillin G in beef and pork tissues using an automated LC cleanup. **Journal of Agriculture and Food**, v. 46, p. 1410-1413, 1998.
- OFFLER D. L, TERNES, T.A., **Journal.Chromatography A** 1021, 133, 2003.
- PALERMO, J.N. Antimicrobianos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinário**, a. 7, n. 22, p. 7-17, 2001.
- RAMÍREZ, A., GUTIÉRREZ, R., GONZÁLEZ, C. et al. Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México. **Revista de Salud Animal**.v. 23, n. 1, p. 37-41, 2001.Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.39, n.235, n.7-12, 1984.
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytical Chimia Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.
- VERDON, E., COUEDOR, P. **HPLC/UV determination of residues of cephalosporins in pork and beef muscle tissues**. Fougères: Laboratory for Researches and Studies on Veterinary Drugs and Desinfectants, Community Reference

CAPÍTULO 4

ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANFENICÓIS E IDENTIFICAÇÃO DE β -LACTÂMICOS EM LEITES INTEGRAIS UHT E EM PÓ POR CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

ANÁLISE QUANTITATIVA DE RESÍDUOS DE ANFENICÓIS E IDENTIFICAÇÃO DE β -LACTÂMICOS EM LEITES INTEGRAIS UHT E EM PÓ POR CROMATOGRAFA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE MASSAS

Mariem R. RIBEIRO-CUNHA* Helena Teixeira GODOY**

*Fundação Ezequiel Dias / Instituto Octávio Magalhães / Divisão de Vigilância Sanitária / Serviço de Química - Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira – 30510-010, Belo Horizonte-MG – Brasil.

**Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP – 13083-970, Campinas-SP – Brasil.

RESUMO. O leite é um produto de grande importância na alimentação humana, e como alimento, deve chegar às mãos dos consumidores como um produto saudável e nutritivo. No entanto, antibióticos são utilizados no gado leiteiro para prevenção ou tratamento de doenças, com destaque para as infecções da glândula mamária e as doenças do trato reprodutivo. Sua utilização indiscriminada pode estar associada à presença de resíduos no leite e em seus derivados acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) permitidos. Logo, a demanda por um controle da qualidade deste produto levou ao desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que permitiram avaliar o teor de resíduos de antibióticos, visando garantir a qualidade dos alimentos, a segurança do consumidor e o reconhecimento mútuo a nível internacional. Foram analisadas 475 amostras de leites integrais UHT e 140 em pó perfazendo um total de 615. A coleta foi realizada pelas Vigilâncias Sanitárias dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Espírito Santo e Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia, Pará e Rondônia no período de julho de 2006 a junho de 2007. As amostras foram previamente submetidas ao ensaio de Kit SNAP e de Kit ELIZA para cloranfenicol e β -Lactâmicos, respectivamente. O método de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado ao detector de massas, (CLAE/EM) foi utilizado para confirmar quantitativamente os antibióticos cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol, e qualitativamente os β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilinas G e V, cefapirina,

cefalotin, cefazolin, cefoperazone e ceftiofur). Observou-se que 0,65% do total de amostras de leite UHT foram confirmadas, enquanto na triagem 4,11% foram reagentes. Para o leite em pó, somente 1,44% do total de amostras, foram confirmadas para florfenicol, enquanto na triagem 30,9% das amostras foram reagentes. Na triagem foi detectada a presença de resíduos de β -lactâmicos em 3 amostras de leite UHT (representando 0,65% das amostras) e 3 amostras de leite em pó (representando 2,14% das amostras). Nas seis amostras foi confirmado por CLAE/EM o resíduo de cefapirina.

Palavras-chave: leite, penicilinas cefalosporinas, antibióticos, cromatografia.

ABSTRACT: The milk is a food of great importance in the human feeding. And as food, it should arrive to the consumers' hands as a healthy and nutritious product. The production of safe alimentary goods constitutes one of the Alimentary Safety's most important requirements. The antibiotics are used in the cattle milkman for prevention or treatment of diseases, with prominence for the infections of the mammary gland and the diseases of the reproductive treatment. Your indiscriminate use can be associated to the presence of residues in the milk and in yours flowed above the Maximum Limits of Residues (LMR) allowed. The demand for a control of the quality of this product, took to the development of reliable analytic methods that you/they allow to evaluate the tenor of residue of antibiotics seeking to guarantee the quality of the victuals, the consumer's safety and the mutual recognition at international level. 475 samples of integral milks were analyzed UHT and 140 powdered, covering a total of 615. The collection was accomplished by the Sanitary Surveillances of States of Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia, Pará in the period from July 2006 to June of 2007. The samples were previously submitted to Kit SNAP rehearsal and of Kit ELIZA for chloranphenicol and β -Lactamics respectively. The method of high performance liquid chromatography coupled with simple quadrupole mass detection (HPLC/MS) it was used to confirm quantitatively the antibiotics

chloranphenicol, thiamphenicol and florphenicol and qualitatively the β -lactamics (ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, penicillins G and V, cephapirin, cephalothin, cephazolin, cefoperazone and ceftiofur). We found that 0.65% of total samples of milk were confirmed, while 4.11% were in the screening reagents. For milk powder only 1.44% of total samples, were confirmed to florfenicol, while 30.9% in the screening of samples were reactive. Sorting was detected in the presence of residues of β -lactams in 3 samples of milk (0.65% of total samples) and 3 samples of milk powder (2,14% of total samples). In all were confirmed by HPLC/MS of the residue cephapirin.

Word -keys: milk, penicillins, cephalosporins, antibiotics, chromatography.

1. INTRODUÇÃO

Quando se fala de segurança na cadeia alimentar, fala-se de controle de qualidade em todas as etapas de produção de um alimento, ou seja, controle de todas as atividades relacionadas à produção, beneficiamento, armazenamento, transporte, industrialização, embalagem, reembalagem, comercialização, utilização e consumo de alimentos, considerando-se suas interações com o meio ambiente, o homem e seu contexto sócio econômico. Entende-se também por etapas de produção, a produção no campo; o processamento da matéria-prima e uso de tecnologias na fabricação; o uso de aditivos e coadjuvantes de tecnologia; o uso de embalagens; transporte e armazenamento do produto ou alimento.

Os antibióticos são usados em animais, em primeiro lugar porque, como os humanos, os animais também adoecem, e em segundo porque quando aplicados à produção, permitem aos produtores criarem seus animais de tal forma para garantir o abastecimento do mercado de alimentos. Faz parte deste contexto toda a cadeia do leite, no mundo inteiro.

O ponto crítico principal de controle da contaminação química do leite é a

presença de resíduos de antibióticos. Segundo FOLLY & MACHADO (2001), essa contaminação pode ocorrer através de fontes direta, pelas adulterações com o objetivo de prolongar a vida útil do leite, ou indireta, em consequência do tratamento indicado pelo veterinário para gado leiteiro. O risco à saúde do consumidor deve-se, principalmente, aos efeitos alérgicos em indivíduos sensíveis, a resíduos tóxicos, carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da flora intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores, além dos problemas referentes à indústria de laticínios, pois podem interferir no processo de fermentação. Segundo BORGES et al. (2000), além das reações alérgicas e da indução de quadros patológicos, a presença de resíduos de antibióticos no leite possibilita a indução de resistência bacteriana e, posteriormente, a transferência de resistência múltipla entre os microorganismos. A questão da resistência a antibióticos tem sido considerada um problema global de saúde pública, sendo a resistência múltipla a drogas observada em muitas linhagens de bactérias (NERO et al, 2004).

Segundo GIGANTE (2004), em relação ao leite que chega à indústria já contaminado com resíduos de antibióticos, nada se pode fazer. Os tratamentos usuais como a filtração, o resfriamento e tratamento térmico na faixa de 71-75°C por 15 a 20 segundos têm pouca ou nenhuma influência sobre o conteúdo de antibióticos. Tratamento com temperaturas mais elevadas, 130-145°C por 2 a 4 segundos, não os destrói em 100%.

Considerando a cadeia produtiva do leite, níveis zero de resíduos de antibiótico seriam irreais, mas a concordância com os limites máximos de resíduos (LMR) seria imprescindível para garantir os aspectos de segurança ligado ao seu consumo (PICININ, 2003). A observação de maior número de amostras positivas detectadas pelos testes de triagem pode estar relacionada a diversos fatores, como a não observação do período de carência ou o relaxamento dos produtores em relação à falta de fiscalização. Portanto, esses contribuem com o aumento do risco para a saúde pública e colocam em risco os procedimentos tecnológicos (HOTTA, 2003; NAVRÁTILOVÁ, 2008).

No Brasil, o monitoramento dos resíduos de antibióticos no leite cru é realizado nos caminhões refrigerados que transportam o mesmo para a indústria,

com posterior rastreamento das amostras individuais dos produtores. Assim, se uma amostra individual apresentar resultado positivo, ao realizá-lo novamente, o resultado pode ser mascarado devido à diluição com outros leites de outros produtores. Desta forma, a preocupação por parte dos órgãos fiscalizadores de diversos países vem sendo expressa pelas ações de saúde pública, visando assegurar a qualidade dos alimentos de origem animal (MONARDES, 2004).

Inúmeros testes qualitativos e quantitativos para detectar resíduos de antibióticos têm sido desenvolvidos desde 1940, sendo os microbiológicos os mais utilizados, porque são mais simples e baratos. Esses se baseiam no princípio geral de que todos os antibióticos inibem bactérias sensíveis.

No que diz respeito ao tratamento da amostra, a extração líquido-líquido (LL) foi a mais utilizada, mas a extração em fase sólida também vem ganhando o interesse dos pesquisadores. A introdução de vários tipos de adsorventes sólidos tem tornado a técnica de extração mais robusta, com a aplicação de vasta gama de polímeros. Os mais utilizados são os adsorventes poliméricos (poli) estireno-divinilbenzeno e co-polímeros, que são, frequentemente, utilizados para a extração de amostras biológicas e de resíduos de medicamentos (FELTRIN, et al., 2007).

Vários pesquisadores demonstraram a extração de amoxicilina e ampicilina de músculo bovino, fígado, rim e leite em fase sólida, utilizando água quente seguida da quantificação por CLAE/EM (BOGIALLI et al., 2004; URAIRAT et al., 2007; QIONG-HUI Z, 2005). Eles monitoraram o modo de aquisição com duas reações de fragmentação para cada antibiótico e obtiveram um limite de quantificação de 1 µg/L, 3,1 µg/kg e 0,8 µg/kg para o leite, fígado e rim respectivamente.

As atuais técnicas para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários têm combinado a alta eficiência de separação com a garantia da identidade, sendo utilizada para essa finalidade a cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CLAE/MS). A fonte de ionização mais utilizada para análises de resíduo de antibióticos tem sido o eletrospray (MUÑOZ et al., 2005; FAGERQUIST et al., 2005; MASTOVSKA, 2008). BECKER et al. (2004) comprovaram que a sensibilidade mais alta foi alcançada para a

amoxicilina, ampicilina cefalexina, cefapirina, desacetilcefapirina, cefalotin, cefoquinona e cefazolin quando medidas no modo de ionização positivo (ESI (+)) e para o cefoperazone, benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e nafcilina quando medidos no modo de ionização negativo (ESI (-)).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de resíduos de antibióticos em leite UHT e em leite em pó, provenientes de vários estados do Brasil, utilizando uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

2. MATERIAIS

2.1. Reagentes, solventes e materiais diversos

Foram utilizados os seguintes padrões de antibióticos: cefalotim sódico (Fluka Lote 22241, pureza 99%), cefapirina sódica (Sigma Lote 112K0485, 94,9%), cefazolim sódico (Fluka Lote 22127, 98%), cefoperazone sódico (Sigma Lote 073K1281, 93,7%), ceftiofur (Pharmacia Lote 001/02, 93,7%), cefotaxim (Fluka Lote 22128-5G), amoxicilina (Materia-prima Sem lote), ampicilina (Fluka Lote 10044-5G), penicilina V (Riedel-de-Haen Lote 46616), penicilina G (Sigma Lote 455901/1), cloxacilina (Fluka Lote 27555), dicloxacilina (Sigma.Lote D9016-5G) e oxacilina (Sigma.Lote 28221-5G). Os reagentes de uso comum em laboratório foram de grau analítico e os solventes para a cromatografia de grau cromatográfico, além de água ultrapura obtida no sistema Milli-Q (Millipore®).

As amostras foram filtradas em cartuchos Millex- PVDL (Millipore®) de 0,45 µm e a fase móvel em filtros PVDL de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore®). Foram utilizados dois tipos de cartuchos de extração em fase sólida, o HLB-OASIS de 200 mg de capacidade de 6 mL da Waters e o Centricon 30.000 (Millipore) utilizado na limpeza do extrato das amostras.

Para a triagem das amostras foram utilizados os Kit SNAP e Kit ELIZA-Ridescream da R-Biopharma e o Skim Milk da Difco (leite em pó desnatado) livre de antibiótico foi utilizado como referência.

Os reagentes de uso comum em laboratório foram de grau analítico e os

solventes para a cromatografia de grau cromatográfico, além de água ultrapura obtida no sistema Milli-Q (Millipore®).

2.2. Vidraria

Foram utilizadas vidrarias com certificado da Rede Brasileira de Metrologia e as de uso comum do laboratório.

2.3. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica, vórtex, manifold, centrífuga modelo CR22G (Hitachi), evaporadora rotativa (Joan), ultra-purificador de água Milli-Q (Millipore), ultra-som e um cromatógrafo a líquido modelo Class Vp (Shimadzu), composto de sistema desgaseificador a hélio, duas bombas, injetor automático de 1 a 50 μL de capacidade, forno para coluna, coletor de frações e detectores, dispostos em série, de arranjo de diodos e de massas com fonte de ionização por *eletrospray* e simples quadrupolo, modelo LCMS-210A (Shimadzu). O sistema foi monitorado por um software, que também auxiliou na aquisição e no tratamento de dados.

2.4. Preparo dos Padrões

2.4.1. Solução padrão estoque dos anfenicóis

As soluções estoques dos padrões de antibióticos foram preparadas pesando separadamente, em balança analítica, 10 mg de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol. A seguir, foram dissolvidos em metanol, grau cromatográfico, e transferidos quantitativamente para um balão de volumétrico de 10 mL. As soluções foram homogeneizadas, transferidas para frascos e guardadas em freezer a -18°C . A concentração desta solução foi de 1 mg/mL.

2.4.2 Solução padrão intermediária I de anfenicóis

Pipetou-se separadamente 25 μL da solução padrão estoque de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol (1,0 mg/mL), utilizando pipeta automática de 10-100 μL para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água ultrapura,

homogeneizou-se e transferiu-se para frascos âmbar de 10 mL. A concentração final de cada solução intermediária de cloranfenicol florfenicol e tianfenicol foi de 250 ng/mL.

2.4.3. Solução intermediária II de tianfenicol

Pipetou-se 250 µL solução estoque padrão de tianfenicol com pipeta automática de 100 -1000 µL para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água ultrapura, homogeneizou-se e transferiu-se para frascos âmbar de 10 mL. A concentração final das soluções intermediárias de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol foi de 2,5 µg/mL

2.4.4. Solução de pool do padrão de anfenicóis

Pipetou-se 25 µL de cada solução estoque padrão de cloranfenicol, florfenicol e tianfenicol usando pipeta automática de 10-100 µL para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água ultra pura, homogeneizou-se e transferiu-se para frascos âmbar de 10 mL. A concentração final do pool de padrões dos anfenicóis foi de 250 ng/mL

2.4.5. Solução de pool de padrões de anfenicóis para o efeito matriz.

Pipetou-se 80, 100, 150, 200, 400, 500, 750 e 1000 µL da solução padrão intermediária I de cloranfenicol (250 ng/mL); 200, 250, 300, 400, 600, 700 e 800 µL da solução padrão intermediária I de florfenicol (250 ng/mL); 80, 100 e 250 µL da solução padrão intermediária I de tianfenicol (250 ng/mL) e 100, 250, 500, e 750 µL da solução padrão intermediária II de tianfenicol (2,5 µg/mL). Cada volume destes foi colocado em balão volumétrico de 25 mL, tendo o volume completado com tampão formiato pH=6,5.

2.4.6. Solução padrão estoque dos β-lactâmicos

As soluções estoques dos padrões de antibióticos foram preparadas pesando separadamente em balança analítica 10 mg de amoxilina, oxacilina dicloxacilina, cloxacilina, ampicilina, penicilinas V e G, cefapirina, ceftiofur, cefazolin, cefalotin, cefoperazone e cefotaxim. Os padrões foram dissolvidos em água ultrapura e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual se adicionou 2 mL de metanol grau cromatográfico, completando-se o volume com água

ultrapura. A concentração resultante foi de 1,0 mg/mL. As soluções foram estocadas em freezer a -18 °C.

2.4.7. Solução padrão intermediária I de β -lactâmicos

Pipetou-se separadamente 100 μ L de cada solução padrão estoque (1,0 mg/mL) de β -lactâmicos, utilizando pipeta automática, em um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 2 mL de metanol grau cromatográfico, completando-se o volume com água ultrapura. A concentração desta solução foi de 10 μ g/mL. As soluções foram estocadas em freezer a -18 °C.

2.4.8. Solução padrão intermediária II de β -lactâmicos

Pipetou-se separadamente 500 μ L de cada solução padrão intermediária I de β -lactâmicos (10 μ g/mL), utilizando pipeta automática de 10–1000 μ L para um balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol grau cromatográfico e completou-se o volume com água ultrapura. Homogeneizou-se e transferiu-se para frascos. Guardou-se em freezer a -18 °C. A concentração desta solução foi de 1 μ g/mL.

2.4.9. Pool de padrões de β -lactâmicos A (fortificação das amostras antes da extração)

Pipetou-se 27,8; 27,8; 278; 16,70; 11,10; 13,9; 13,9; 13,9; e 13,9 mL das soluções padrão estoque de 1 mg/mL de ampicilina, amoxicilina, penicilina G, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur de e 560; 560; 560; e 560 mL das soluções intermediárias I de 10 μ L/mL de cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina e penicilina V, respectivamente, para um balão volumétrico de 10mL, utilizando pipeta automática. Foram adicionadas 2 mL de metanol grau cromatográfico e completou-se o volume com água ultrapura. As soluções foram mantidas em freezer a -18°C. A concentração final de ampicilina, amoxicilina, penicilina G, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone, ceftiofur, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina e penicilina V corresponderam a 2,78; 2,78; 27,80; 1,67; 1,11; 1,39; 1,39; 1,39; 1,39; 0,56; 0,56; 0,56 e 0,56 μ g/mL, respectivamente.

2.4.10. Pool de padrões de β -lactâmicos B (fortificação das amostras depois da extração)-Efeito matriz

Pipetou-se 1000; 1000; 300; 300; 300; 300; 600; 400: 500; 500; 500 e 500 μ L da solução padrão intermediária I (10 μ g/mL) de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur e 100 μ L da solução padrão estoque de penicilina G de 1 mg/mL, utilizando pipeta automática para um balão de 25 mL. Completou-se o volume com tampão formiato de amônio 0,1% pH=6,5. As soluções foram mantidas em freezer a -18°C. A concentração final de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone, ceftiofur e penicilina G corresponderam a 1,00; 1,00; 0,30; 0,30; 0,30; 0,30; 0,60; 0,40; 0,50; 0,50; 0,50; 0,50 e 10,0 μ g/mL, respectivamente.

2.4.11. Pool de padrões de β -lactâmicos C (limite de detecção do equipamento)

Foi pipetado 300 μ L da solução padrão intermediária II (1 μ g/mL) de cefapirina, de ceftiofur, de oxacilina, de cloxacilina e de penicilina V, 200 μ L da solução padrão intermediária I (10 μ g/mL) de ampicilina e amoxicilina, 350 μ L cefalotin, 300 μ L cefoperazone, 250 μ L cefazolin e 80 μ L da solução padrão estoque de penicilina G (1 mg/mL) para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com solução tampão formiato de amônio 0,1% pH 6,5. As soluções foram mantidas em freezer a -18°C. As concentrações finais das soluções de cefapirina, ceftiofur, oxacilina, cloxacilina e penicilina V foram de 30 ng/mL, de ampicilina e amoxicilina 200 ng/mL, de cefalotin 350 ng/mL, de cefoperazone 300 ng/mL, de cefazolin 250 ng/mL e de penicilina G 8 μ g/mL.

2.4.12. Pool de padrões de β -lactâmicos D (limite de detecção do método)

Utilizando pipeta automática, pipetou-se 500; 500; 75; 150; 75; 75; 75; 875; 625; 125; 750 e 75 μ L da solução padrão intermediária I (10 μ g/mL) de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone e ceftiofur, respectivamente, de e 223 μ L da solução padrão estoque (1 mg/mL) de penicilina G, para um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 2 mL de metanol grau cromatográfico e completou-se o

volume com água ultrapura. As soluções foram guardadas em freezer a -18°C . A concentração final de ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina V, cefapirina, cefalotin, cefazolin, cefotaxim, cefoperazone, ceftiofur e penicilina G correspondeu a 0,500; 0,500; 0,075; 0,150; 0,075; 0,075; 0,075; 0,875; 0,625; 0,0125; 0,75; 0,075; e 20,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

2.5. Preparo de Reagentes

2.5.1 Solução de extração - Tampão McIlvaine modificado

Pesou-se 5,825 g de fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4), 2,2 g de acetato de amônio ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) e 18,6 g de EDTA, em um béquer, ao qual adicionou-se, aproximadamente, 400 mL de água ultrapura, agitando-se até completa dissolução. O pH foi ajustado a 5,8 com ácido acético ou NH_4OH . Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 500 mL completando-se o volume com água ultrapura.

2.5.2. Solução de limpeza

Em um béquer de 5000 mL pesou-se 50 g de uréia a qual adicionou-se 350 mL de água ultrapura, 5 mL de hidróxido de tetrametilamônio 25% e 50 mL de metanol. O pH foi ajustado a 6,5 com ácido acético. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água ultrapura.

2.5.3. Solução de ácido fórmico e tampão formiato

Pipetou-se 1 mL de ácido fórmico em um balão volumétrico de 1L, completou-se o volume com água ultrapura (solução 0,1%). Transferiu-se 250 mL dessa solução para um béquer ajustando-se o pH a 6,5 (anfenicóis) e pH 8,0 (b-lactâmicos) com NH_4OH (1 mol).

2.5.4. Reagentes e padrões para os ensaios com Kit

Utilizou-se soluções de ferrocianeto de potássio (II) trihidratado 0,36 mols (Carrez I), de zinco heptahidratado 1,04 (Carrez II), do conjugado diluído (1:11), do anticorpo diluído (1:11), tampão fosfato pH 6,0.

2.5.5 Solução padrão estoque e trabalho de β - lactâmico

Preparou-se uma solução de 10 mg/mL do padrão de β -lactâmico com tampão

fosfato pH 6,0. Desta solução prepararam-se soluções de trabalho nas concentrações de 1, 2, 4 e 6 µg/L com leite controle.

2.5.6. Leite de referência Skim Milk

Pesou-se exatamente 10g do leite em pó desnatado (Skim Milk). Dissolveu-se com aproximadamente 60 mL de água ultra pura, levou ao banho-maria 35-37 °C por aproximadamente 30 minutos e completou o volume para 100 ml. Conservou-se em geladeira.

2.6 Amostragem

Leites UHT e em pó foram coletados pela Vigilância Sanitária dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia, Pará e Rondônia, no período de julho de 2006 a junho de 2007, totalizando 475 amostras de leite UHT e 140 amostras de leite em pó integral selecionadas aleatoriamente, perfazendo um total de 615 amostras. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância segundo SNEDECOR & COCHRAN (1980) e MILLER & MILLER (1993).

Antes da retirada da amostra laboratorial, cerca de 1 L de leite UHT era homogeneizado e depois fracionado em três porções de aproximadamente 100mL, transferindo para frascos âmbar e devidamente identificados. As amostras foram armazenadas em freezer até o momento da análise.

Para a triagem de anfenicóis, utilizando o Kit ELISA, a amostra de leite em pó foi preparada pesando-se exatamente 2,00 g, transferiu-se para um tubo de centrifuga, adicionando-se 10 mL de água destilada a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, agitando-se até total dissolução. Para o ensaio de triagem de β -latâmicos (Kit SNAP) reconstituiu-se a amostra de leite em pó na proporção recomendada na embalagem para preparar 100 mL.

3. MÉTODOS

3.1. Triagem de β -lactâmicos em leite por Kit SNAP

Fundamenta-se em uma ligação enzimática específica no anel β -lactâmico do antibiótico. O conjunto enzimático liofilizado presente na pastilha nutriente do Kit é composto por proteínas penicilina-ligante com receptores de superfície específicos, ligados a uma enzima cromogênica, e anticorpos monoclonais para os β -lactâmico. Com a adição da amostra ocorrem as reações com os resíduos β -lactâmicos originando uma coloração azul. Como há anticorpos envolvidos na reação, esta é considerado um imunoensaio.

Colocou-se o dispositivo no bloco aquecedor e, com o auxílio da pipeta dosadora do kit, pipetou-se a amostra de leite até a marca indicadora da pipeta. A amostra foi adicionada com cuidado ao tubo e agitada até a solubilização da pastilha reagente. O tubo foi incubado em bloco aquecedor a 45°C por 5 minutos. Verteu-se todo conteúdo do tubo de amostra no dispositivo de prova do SNAP e aguarda-se 4 minutos. Para resultados negativos o ponto da amostra seria mais escuro ou igual ao ponto do controle, para resultados positivos, o ponto da amostra seria mais claro que o ponto do controle.

O limite de detecção do Kit e testes de pontos controle, preparando-se um ponto negativo utilizando o leite de referência e um ponto positivo com a solução de trabalho acima do limite de detecção, foram realizados para a garantia da utilização do mesmo.

3.2. Triagem de cloranfenicol em leite por Kit ELISA

Fundamenta-se em um imunoensaio enzimático competitivo do tipo Elisa para análises quantitativas de cloranfenicol em leite.

Uma alíquota de aproximadamente 5 mL de leite fluido UHT foi transferida para um tubo de centrífuga, onde foram adicionados 250 μ L da solução de Carrez I e 250 μ L da solução de Carrez II. Após centrifugação a 3.000 g por 10 minutos a uma temperatura de 4 a 12°C, transferiu-se 2,2 mL do sobrenadante (correspondente a 2 mL do leite) para um novo tubo de centrífuga e adicionou-se 4 mL de acetato de etila.

Após nova centrifugação por 10 minutos a 3.000 g a temperatura ambiente (25°C), foi transferido 2 mL do sobrenadante (correspondente a 1 mL de leite) para um novo tubo e evaporou-se até a secura em evaporador rotativo. O resíduo seco foi suspenso em 250 µL de tampão 1. Utilizou-se 50 µL desta solução por poço (fator de diluição=0,25) para o ensaio de triagem por kit ELISA. Foi adicionado, também, 50 µL de cada padrão diluído. Acrescentou-se 50 µL do conjugado diluído no fundo de cada poço e 50 µL do anticorpo diluído, em seguida a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente (25°C). Após esse período de incubação, os líquidos foram descartados e os poços lavados com água ultrapura. Em seguida foram adicionados 50 µL do substrato e 50 µL do cromógeno em cada poço. A placa foi novamente incubada por 30 minutos à temperatura ambiente (25°C) ao abrigo da luz. Adicionou-se, então, 100 µL da solução de parada em cada poço e mediu-se a absorvância a 450 nm contra um branco.

Para as amostras de leite em pó, preparadas como descrito anteriormente, foram transferidos 5 mL aos quais foram adicionados 1 mL de Carrez I e 1 mL Carrez II. S condições de centrifugação foram as mesmas descritas para o leite fluido. Transferiu-se então 3,6 mL do sobrenadante (correspondente a 0,6 mL de leite em pó) para um novo tubo de centrífuga. Adicionou-se a este sobrenadante 6 mL de acetato de etila, seguida de nova centrifugação. Transferiu-se 4 mL do sobrenadante (correspondente a 0,4 g de leite em pó) para um novo tubo que evaporou até a secura no evaporador rotativo. O resíduo seco foi dissolvido com 400 µL de tampão 1. Usou-se 50 µL desta solução por poço (fator de diluição=1) e procedeu-se como descrito para o leite fluido.

Considerou-se positivo as amostras que apresentarem uma concentração maior que o Limite de Desempenho Requerido para o Método (LDRM) que é de 0,3µg/L.

3.3. Análise por CLAE/EM

Cada bateria de análise foi acompanhada de padrões, branco da amostra, branco de reagentes e da amostra fortificada. Todos os ensaios foram realizados em

triplicada e injetados no CLAE/EM aleatoriamente.

3.3.1. Anfenicóis

Um volume de 30 mL de leite foi centrifugado a 5.000 g por 99 min. Retirou-se a fase intermediária com auxílio de uma pipeta, transferindo-se 2,5 mL para dois tubos de falcon de 50 mL, adicionando-se em seguida 2,5 mL de tampão de extração (Tampão McIlvaine modificado) e agitando-se por 20 segundos no vórtex. Adaptou-se o cartucho de extração em fase sólida HLB ao sistema de extração a vácuo tipo manifold, e o mesmo foi ativado com 3 mL de metanol e 3 mL água ultrapura. Sob pressão atmosférica, foi transferido para o cartucho o volume total de cada tubo de falcon, descartando-se o eluato. Lavou-se as paredes do tubo com 2 porções de 1 mL da solução de extração e transferiu-se quantitativamente para o cartucho. Foram passadas 2 porções de 1 mL da solução de limpeza e deixou-se sob vácuo por 30 minutos para secar. O resíduo do cartucho foi eluído com 3 mL de metanol em um balão e o extrato obtido foi evaporado em evaporador rotatório (60°C). Após evaporação, foi lavada a parede do tubo com exatamente 1 mL de tampão formiato de amônio 0,1% (pH 6,5), agitando-se no vórtex até dissolução total do resíduo. Em seguida, adicionou-se 4 mL de acetato de etila e 1 mL álcool isoamílico, agitando-se por mais 30 segundos no vórtex. Após separação das fases, transferiu-se 4 mL do sobrenadante (fase orgânica) para um balão e evaporou-se em evaporador rotatório (60°C) até secar. Retomou-se o resíduo com tampão formiato de amônio e agitou-se no vórtex até completa dissolução. A solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm antes da injeção no CLAE/EM.

Para a separação dos anfenicóis utilizou-se uma coluna Simpack, C₁₈ 100 mm x 2,0 mm x 5 µm. A fase móvel foi constituída de solução de ácido fórmico 0,1% pH 6,5:metanol (60:40) e o sistema de eluição foi isocrático a uma vazão de 0,2 mL/min., com temperatura do forno de 40°C. ; detector LCMS – 2010 EV; fonte ionização electron-spray, modo Sim negativo m/z 321, 354 e 356, sistema isocrático de eluição, volume injetado 20 µL, voltagem 3,0 Kv, temperatura da CDL e Bloco 270°C e fluxo do gás de nebulização.

3.3.2. β -Lactâmicos

Pipetou-se 1 mL do leite controle para um tubo de centrífuga e adicionou 15 mL de acetonitrila. Esta solução foi centrifugada a 5.000 g por 30 minutos a 0 °C. Transferiu-se quantitativamente o sobrenadante para um tubo de falcon de 50 mL e evaporou-se até secar na evaporadora rotativa à 55°C. Retomou-se o resíduo com 1000 μ L de tampão formiato de amônio pH 6,5 e agitou-se em vórtex até completa dissolução. Transferiu-se para o Centricon® 30.000 e centrifugou-se por 90 minutos a 5.000 g. Pipetou-se 180 μ L do sobrenadante para um vial de vidro de fundo cônico e adicionou-se 20 μ L da solução de hidróxido de amônio 0,1% (pH final deve ser aproximadamente 8). A seguir foi injetado no cromatógrafo 80 μ L da amostra. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Para a etapa cromatográfica, utilizou-se coluna XTerra® C18 ,150 x 4,6mm x 3.5 μ m e fase móvel composta por acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (30:70). O sistema de eluição foi isocrático, a uma vazão 0,3 mL/min. e temperatura de 45°C. As condições do detector de massas foram estabelecidas com 1.5 kv de voltagem, temperatura CDL e do Bloco 250°C e fluxo do gás de nebulização 1,5L/min. Os picos foram monitorados no modo SIM positivo (ampicilina m/z=350; amoxicilina m/z=350, 365 e 366; penicilina G m/z=335; cefapirina m/z=424; cefotaxim m/z=456 e 455; cefazolin m/z=455 e 456; cefalotin m/z=414; ceftiofur: m/z=524 e 525; cefoperazone m/z=646) e no modo SIM negativo (penicilina m/z=349; oxacilina m/z=400 e 468; cloxacilina m/z= 434; dicloxacilina m/z=468) nas mesmas condições analíticas, exceto a proporção de fase móvel que foi 50:50.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de julho de 2006 a julho de 2007, foram coletadas 615 amostras de leite integral sendo 475 de leite UHT e 140 de leite em pó, representando 82 marcas diferentes de leite UHT e 39 marcas diferentes de leite em pó, pertencentes a 93 unidades produtoras distintas. Como é preconizado pelo *Codex Alimentarius* para se obter um resultado estatisticamente significativo é necessário que sejam

analisadas, pelo menos, 459 amostras de leite UHT e 90 amostras de leite em pó (ANVISA, 2007-2008). Portanto, este trabalho gerou dados que mostram com significância o estado dos leites comercializados no país, em relação aos resíduos de antibióticos, pois as 615 amostras coletadas representam 103% do que é preconizado em termos de quantidade de amostra.

A **Tabela 1** apresenta o número de amostras de leite integral UHT e leite em pó coletadas e analisadas neste estudo por estado da União.

Tabela 1. Número de amostras de leite coletadas por estado de junho de 2007 a julho de 2008.

Leite Integral	Estado/Número de Amostras												Total
	BA	ES	GO	MG	MS	PA	PR	RJ	RO	RS	SC	SP	
UHT	008	224	550	776	111	222	551	225	113	776	440	779	475
Pó	119	00	220	445	111	004	006	003	009	006	00	107	140
Total	227	224	770	1121	222	226	557	228	222	882	440	996	615

O número de unidades fabris por estado coletor e por estado produtor (origem do produto) de leite integral UHT mostrou que os estados da Bahia e Rio Grande do Sul somente coletaram os produtos provenientes de indústrias sediadas em seu próprio estado. Os estados de São Paulo, Goiás, Rondônia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Pará coletaram amostras de outros estados produtores, com exceção de uma amostra da Argentina coletada no RS. Paraná, Santa Catarina e Rio de Janeiro, além da produção própria, coletaram amostras de apenas de um outro estado. O estado de São Paulo foi o que coletou maior número de amostras de leite produzido em outros estados (75,95%), chegando a coletar 24 amostras do estado do Rio Grande do Sul e 24 de Goiás, número acima das coletadas do seu próprio estado (19). Pará, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Goiás coletaram respectivamente 59, 62, 5, 36,4 e 30% de amostras de leite produzido em outros estados. Os demais estados mantiveram a maior quantidade de

amostras coletadas de leite produzido em seu próprio território.

Para leite integral em pó, os estados da Bahia, Paraná, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul coletaram apenas leite produzido em seu próprio estado. O estado de São Paulo coletou amostras de outros cinco estados, destacando-se novamente pelo maior número de amostras coletadas procedentes de outros estados produtores, 11 amostras, correspondendo a 70,59% (incluindo uma importada), enquanto que de seu próprio estado foram coletadas apenas cinco amostras. Todas as amostras coletadas pelos estados de Mato Grosso do Sul, Pará e Rondônia foram produzidas em outros estados.

Os limites de detecção do método estabelecido pelos fornecedores dos kits para os ensaios de triagem de β -lactâmicos foram confirmados e corresponderam a 4,0 $\mu\text{g/L}$ para β -lactâmicos em leite UHT e em pó.

Das 475 amostras de leite UHT integral, apenas três foram positivas para presença de β -lactâmicos (0,64%), e das 140 amostras de leite integral em pó, também apenas três foram positivas (2,14%).

As seis amostras positivas foram submetidas a análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas, simples quadrupolo, (CLAE/EM) para identificação dos antibióticos β -lactâmicos. Avaliando-se os perfis cromatográficos da amostra de leite UHT, em relação à resposta obtida para os padrões em solvente, branco da amostra, e branco de reagente, não foi observada a presença de compostos de relação m/z e de tempo de retenção iguais aos do ceftiofur, cefazolin, cefalotin, cefoperazone, cefotaxim, amoxicilina, ampicilina, penicilina G, oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e penicilinas V. No entanto, foi identificado resíduo de cefapirina.

A presença do resíduo de cefapirina foi confirmada pela co-cromatografia ao comparar o perfil cromatográfico da amostra de leite UHT adicionado do padrão.

A seletividade do método foi evidenciada pela comparação dos perfis cromatográficos do branco de reagentes, branco da amostra de leite controle e do pool de padrões de β -lactâmicos, uma vez que não apresentaram substância interferente na região dos antibióticos pesquisados. Na **Figura 1**, está representado

o perfil cromatográfico da amostra de leite UHT fortificada, apresentando apenas a razão m/z da cefapirina. Para os demais antibióticos os perfis cromatográficos estão apresentados nos **Anexos I, II e III**.

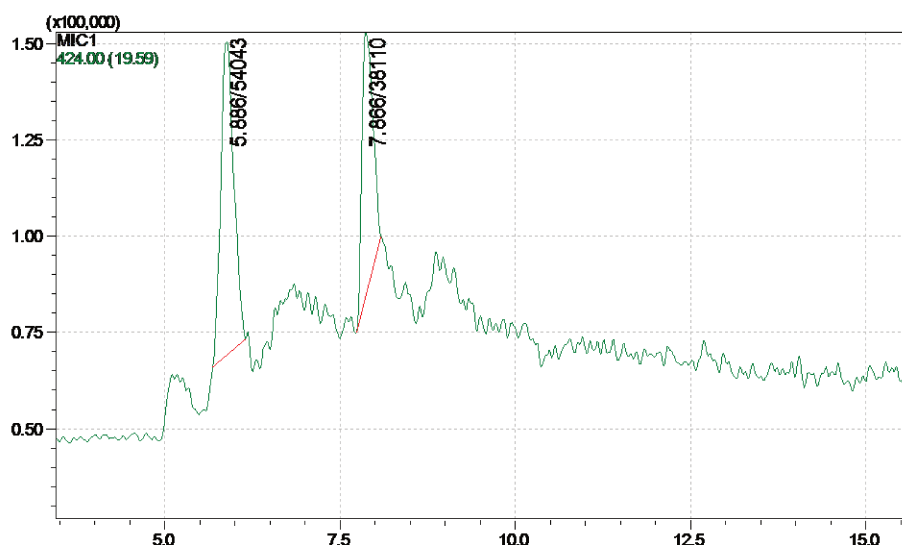


Figura 1: Perfil cromatográfico de amostra de leite UHT fortificada no Modo Sim positivo cefapirina m/z 424, Tr = 7,85.

Os limites de detecção do método (LDM) para os antibióticos β -lactâmicos encontrados pelo método de CLAE/EM corresponderam a 1,5 $\mu\text{g/L}$ para oxacilina cloxacilina, penicilina V, ceftiofur, cefapirina; para a cefalotina 17,5 $\mu\text{g/L}$; para o cefoperazone 15,0 $\mu\text{g/L}$; para o cefazolin 12,5 $\mu\text{g/L}$; 400 $\mu\text{g/L}$ para penicilina G, e 10,0 $\mu\text{g/L}$ para ampicilina e amoxicilina. Os resultados obtidos mostraram que tanto as amostras de leite UHT quanto as de leite em pó integral apresentaram ensaio de triagem positivo para β -lactâmicos, neles confirmada a identificação de cefapirina.

Algumas das amostras que apresentaram resultados negativos para os β -lactâmicos no ensaio de triagem por Kit SNAP foram também submetidas ao procedimento de CLAE/EM. Os resultados mostraram que a relação sinal ruído do perfil cromatográfico da amostra de leite UHT foi menor que 1,5 $\mu\text{g/kg}$ (LDM da cefapirina) quando comparado ao perfil da amostra de leite controle adicionada do pool de padrões de β -lactâmicos na concentração do LDM. Esse resultado foi

confirmado ao se compararem os perfis cromatográficos da amostra de leite UHT adicionada de 1,5 µg/L e sem adição, do pool dos padrões de β-lactâmicos, do branco da amostra controle e branco dos reagentes.

As amostras de leite em pó, que tiveram seu resultado positivo quando à presença de resíduos de β-lactâmicos, tiveram o mesmo comportamento dos leites UHT, evidenciando apenas a presença de resíduos de cefapirina. Quando se comparou a relação sinal/ruído da amostra de leite em pó com a resposta da amostra controle adicionada do limite de detecção do método (LDM), verificou-se que esta foi > 3 para a cefapirina, evidenciando a confirmação do antibiótico da classe das cefalosporinas. Os resultados apontaram, ainda, a presença de resíduo de cefapirina acima do LDM.

Foi possível verificar a origem do leite analisado na triagem, ou seja, o estado produtor. Vale ressaltar que essa informação é muito importante, uma vez que nem sempre o leite coletado em um estado significa que seja produzido nele. As amostras que apresentaram resíduos de cefapirina foram provenientes de leite UHT produzidos nos estados do Pará, Paraná e Rio de Janeiro e de leite em pó da Argentina, Goiás e Minas Gerais. Esses dados permitirão verificar se as boas práticas veterinárias estão sendo adotadas nos locais de produção.

Para triagem dos anfenicóis, foram analisadas as 615 amostras. Destas, 19 amostras de leites UHT (4,10%) e 43 amostras de leite em pó (30,94%) foram reagentes no ensaio de cloranfenicol por Kit ELISA, apresentando valores acima de 0,3 µg/L. Embora os limites de detecção e quantificação do kit ELISA para o cloranfenicol, segundo o seu manual, ser de 37,5 ng/kg e 50 ng/kg para leite UHT e 50 ng/kg e 150 ng/kg para leite em pó, foi considerado o limite de quantificação requerido para um método analítico estabelecido pela Comissão de Decisão 2003/181/EC da Comunidade Europeia.

As amostras que apresentaram resultado no kit ELISA ≥0,3 µg/L de cloranfenicol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em detector de massas simples quadrupolo (CLAE/EM). Os resultados mostraram que, das 19 amostras de leite fluido avaliadas, 3 confirmaram o

cloranfenicol entre o limite de detecção e o de quantificação do método, ou seja, maior do que o limite de detecção do método ($\geq 0,3 \mu\text{g/L}$) e menor que o limite de quantificação ($0,77 \mu\text{g/L}$). Ao comparar o perfil cromatográfico das amostras de leite UHT, foi observada a presença do composto de relação $m/z=321$ e $Tr=7,0$ evidenciando a confirmação da molécula do cloranfenicol. Não foram observados compostos de relação $m/z=354$ e $Tr=3,0$ e $m/z=356$ e $Tr=4,0$ correspondentes ao tianfenicol e florfenicol, respectivamente. Esses resultados foram confirmados pela co-cromatografia, ao avaliar a resposta da amostra de leite UHT adicionada do pool de padrões dos anfenicóis.

Pôde-se verificar, ao se comparar o perfil cromatográfico da amostra com o da amostra adicionada com os padrões em solvente, que a relação sinal ruído foi maior que $0,3 \mu\text{g/L}$ (LDM) para a molécula do cloranfenicol e menores que $0,0204 \mu\text{g/L}$ (LDM) para o tianfenicol e $0,0935 \mu\text{g/kg}$ (LDM) para o florfenicol, respectivamente.

Pelos resultados alcançados, concluiu-se que, das 19 amostras de leite UHT submetidas à análise de confirmação por CLAE/EM, apenas três (0,65%) confirmaram a molécula de cloranfenicol, sendo uma amostra coletada no estado de Goiás e duas em Minas Gerais. Os resultados das análises de confirmação da molécula de cloranfenicol por CLAE/EM nas amostras de leite UHT positivas no ensaio de triagem por Kit ELISA por estado produtor mostraram que as duas amostras foram provenientes de Goiás e uma de Minas Gerais.

As 43 amostras de leite em pó que apresentaram resultados positivos para cloranfenicol no ensaio de triagem por kit ELISA foram analisadas por CLAE/EM para confirmação da presença de anfenicóis. Em nenhuma amostra foi detectada a presença dos resíduos de cloranfenicol e tianfenicol. No entanto, 2 amostras de leite em pó confirmaram a presença de resíduo de florfenicol, acima do limite de detecção (LDM) e abaixo do limite de quantificação do método (LQM), ou seja $\geq 0,0935 \mu\text{g/L}$ e $\leq 0,1519 \mu\text{g/L}$.

Ao se comparar o perfil cromatográfico das duas amostras de leite pó, foi observada a presença do composto de relação $m/z=356$ e $Tr= 4,0$, evidenciando a confirmação do resíduo da molécula de florfenicol. Não foram observados os de

relação $m/z=354$ e $Tr=3,0$ (tiafenicol) e $m/z=321$ e $Tr=7,0$ (cloranfenicol). Esses resultados foram confirmados pela co-cromatografia, ao avaliar a resposta da amostra adicionada do pool de padrões dos anfenicóis em relação à sem adição. Pelos resultados alcançados, concluiu-se que, das 43 amostras de leite em pó submetidas à análise de confirmação por CLAE/EM, apenas duas (1,44%) confirmaram resíduo da molécula de florfenicol, sendo uma amostra produzida e coletada no estado de Minas Gerais e outra amostra coletada em Rondônia, de leite produzido em São Paulo.

6. CONCLUSÕES

Para cloranfenicol, observou-se que 0,65% do total de amostras de leite UHT foram confirmadas, enquanto na triagem 4,11% foram reagentes. Para o leite em pó, somente 1,44% do total de amostras, foram confirmadas para florfenicol, enquanto na triagem 30,9% das amostras foram reagentes.

Na triagem, foi detectada a presença de resíduos de β -lactâmicos em 3 amostras de leite UHT e 3 amostras de leite em pó. Em todas foi confirmado, por CLAE/EM, o resíduo de cefapirina, que é um β -lactâmico da classe das cefalosporinas, representando, respectivamente, 0,65% e 2,14% do total das amostras.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520 n. 1-2, p. 19-32, 2004.

BOGIALLI, S.; CAPITOLINO, V.; CURINI, R. CORCIA, A., NAZZARI, M.; SERGI, M. Simple and Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for Determining Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Tissues and Milk. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 52, 3286-3291, 2004.

- BOGIALLI, S.; CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; MASTRANTONI, V.; SERGI, M. A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by liquid-chromatograph/-tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Sp**, v. 21, p.237-246, 2007.
- FAGERQUIST, C.K, LIGHTFIELD, A.R, LEHOTAY, S.J. Confirmatory and quantitative analysis of β -lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 1, n.77, p. 1473-1482, 2005.
- FELTRIN, C.W.; MELLO, A.M.S.; SANTOS, J.G.R.; MARQUES, M.V.; SEIBEL, N.M.; FONTOURA, L.A.M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química. Nova**, v.30, n.1, p. 80-82, 2007.
- FOLLY & MACHADO 2001.**
- GALLINA, D. A. **Avaliação de tratamentos térmicos industriais sobre resíduos inibidores presentes no leite utilizando o teste de inibição de iogurte**. 1997. 69 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa.
- GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J.W. et al. (Org.) **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo – RS. Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 235-254.
- HOOGERBRUGGE, R., STOLKER A.A.M.; BARENDREG, A.; HOGENDOOR, E.A. A systematic approach for optimisation of supercritical-fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from earthworms **Analytical Biological Chemistry**, 377, 715, 2003.
- HOTTA, J. M. **Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. p. 11-37. 2004.
- LEME, F.B.P.; DIAS, R.A.; RAMOS-SILVA E.O.T. et al. Presença de antimicrobianos

- de uso veterinário em amostras de diferentes tipos de leite comercializados na cidade de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo – RS. **Anais...** Passo Fundo, 2004. (CDRoom).
- MASTOVSKA, K, LIGHTFIELD, A.R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotic sin bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography. A**, v.22, n. 1202, p. 118-23, 2008.
- MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: DÜRR, J. W. et al. (Org.) **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo – RS. Universidade do Passo Fundo, p.11-37, 2004.
- MUÑOZ , P.; BLANCA, J., RAMOS, M.; BARTOLOMÉ, M.; GARCÍA, E.; MÉNDEZ, N. GÓMEZ, J.; POZUELO, M. A versatile liquid chromatography–tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs. **Analytica Chimica Acta**, v. 529 p. 37–144, 2005.
- NAVRÁTILOVÁ P. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review. **Czech Journal Food Science**, 26 :393-401, 2008.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 211-215, 2004.
- PICININ, L. C. **A. qualidade do leite e água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais**. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- QIONG-HUI, Z., YUAN L., MENG-XIA X.; JIE, H.; LEI. Z. A rapid method for determination and confirmation of the thyreostats in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** ,v. 551 p.184-191, 2005.
- URAIRAT, K.; SIRIPASTR, J.; NATCHANUN, L. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. **Journal**

of chromatography, v. 1140, n. 1-2 p. 147-56, 2007.

VAN RHIJN, J.A., LASAROMS J.J.P., BERENDSEN, B.J.A. BRINKMAN, U.A.T.H.

Journal Chromatography A, v. 121, p 960968, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

O método empregado para as análises de confirmação de resíduos de β -lactâmicos e de anfenicóis se mostrou eficiente para a avaliação desses resíduos em amostras de leite UHT e em pó integrais. Nas amostras de leite UHT e em pó que apresentaram resultados negativo para β -lactâmicos no ensaio de triagem por kit SNAP, não foram confirmadas a presença de resíduo de β -lactâmicos quando foram analisadas por CLAE/EM.

O Kit SNAP pode ser utilizado como ensaio de triagem para β -lactâmicos e os resultados devem ser confirmados por CLAE/EM/EM.

A necessidade de análise em um CLAE/EM/EM visa permitir a quantificação dos resíduos de β -lactâmicos.

A utilização do kit SNAP por CLAE/EM/EM ou detector simples quadrupolo torna o processo mais barato, visto analisar somente os positivos na triagem. Além disso, permite a utilização do ensaio SNAP pelos laboratórios da rede pública, que ainda necessita de pessoal capacitado em análises cromatográficas.

Os resultados apontaram que a utilização do kit ELISA como ensaio de triagem na análise de cloranfenicol deve ser acompanhada pela confirmação por CLAE/EM/EM.

Os resultados do ensaio de triagem por KIT ELISA indicaram um número significativo de amostras falso positivas.

SUGESTÕES

Esses resultados sugerem a necessidade do emprego do CLAE/EM/EM como método confirmatório dos resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol e β -lactâmico para amostras positivas no ensaio de triagem, visando confirmar estes limites e adequação às normas internacionais.

É preocupante a confirmação da presença de resíduos de cloranfenicol em alimentos de origem animal, uma vez que é uma molécula proibida na formulação de medicamentos veterinários para uso em animais de produção, tendo em vista os riscos associados à saúde humana.

ANEXO I

Cromatogramas e Espectros de Massas de B-Lactâmicos Modo Positivo Padrões Individuais

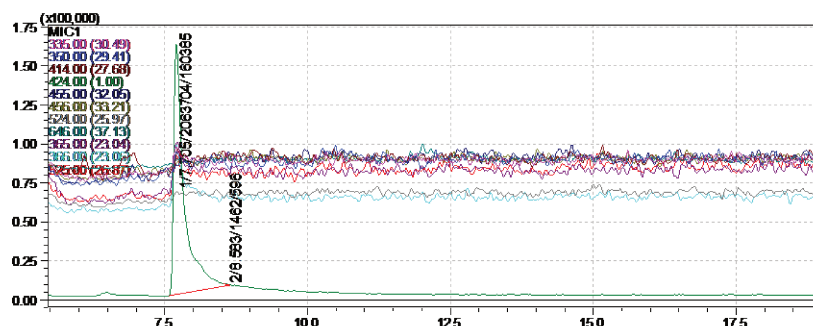


Figura 1 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo cefapirina ($m/z=424$; $Tr=7,71$).

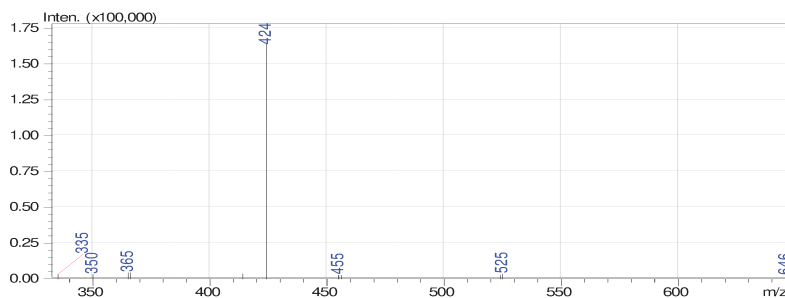


Figura 2 Espectro de massas do padrão no Modo positivo cefapirina ($m/z=424$; $Tr=7,71$).

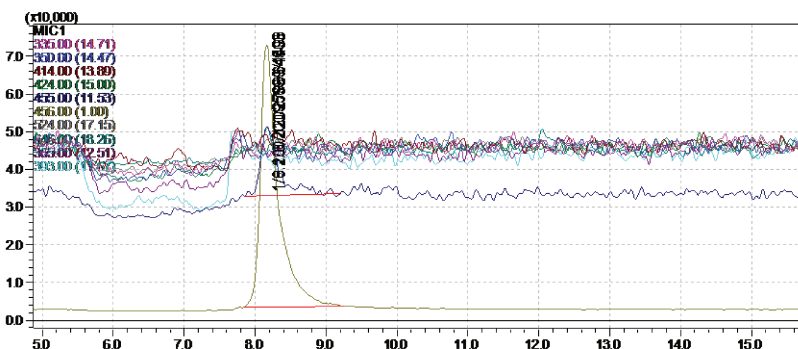


Figura 3 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo cefotaxim ($m/z=455$ e 456 ; $Tr=8,20$).

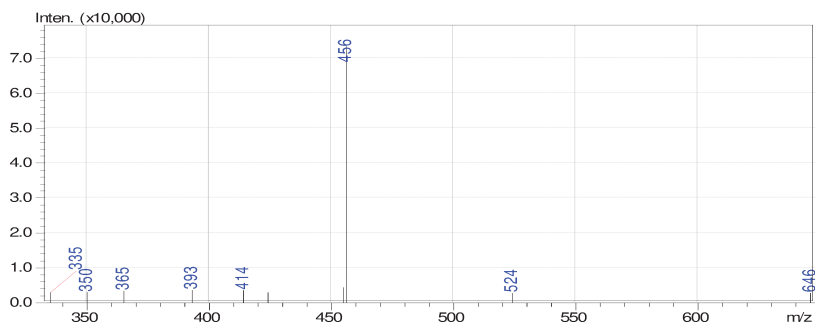


Figura 4 Espectro de massas do padrão no Modo positivo cefotaxim ($m/z=455$ e 456 ; $Tr=8,20$).

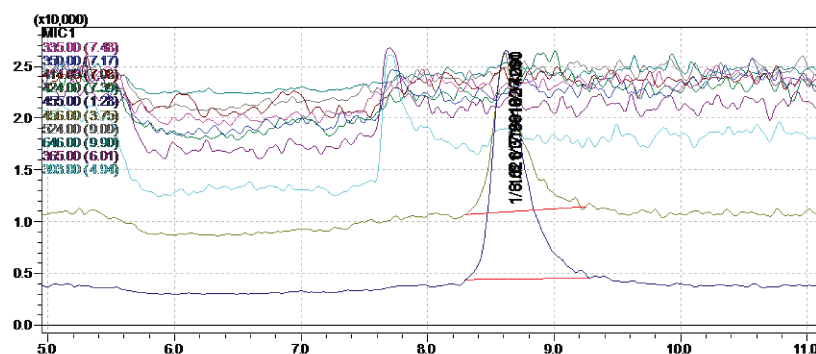


Figura 5 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo cefotaxim ($m/z=455$ e 456 ; $Tr=8,65$).

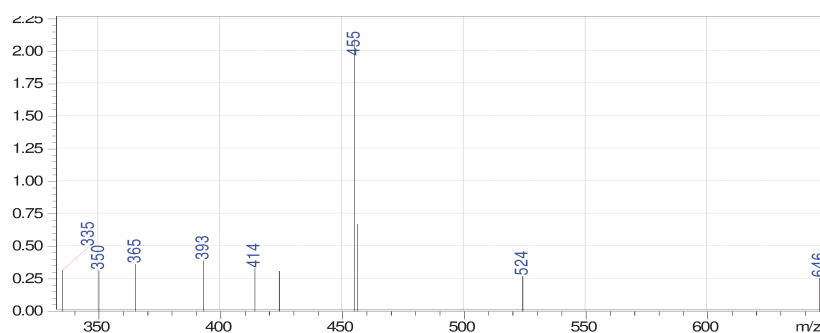


Figura 6 Espectro de massas do padrão no Modo positivo cefotaxim ($m/z=455$ e 456 ; $Tr=8,65$),

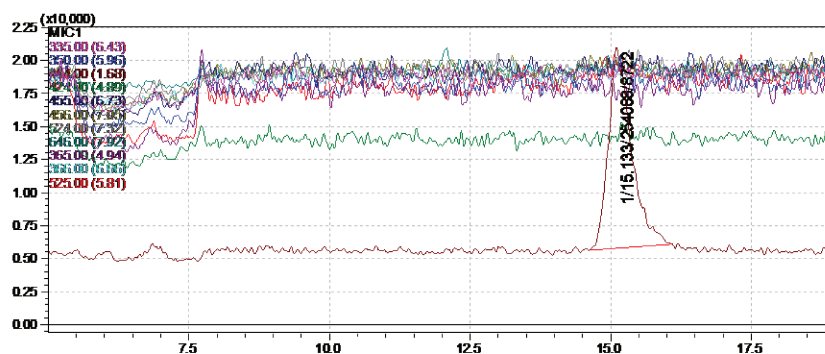


Figura 7 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo cefalotin ($m/z=414$; $Tr=15,13$),

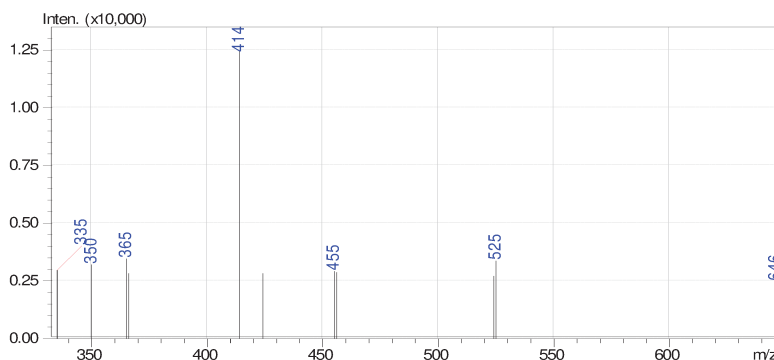


Figura 8 Espectro de massas do padrão no Modo positivo cefalotin ($m/z=414$; $Tr=15,13$),

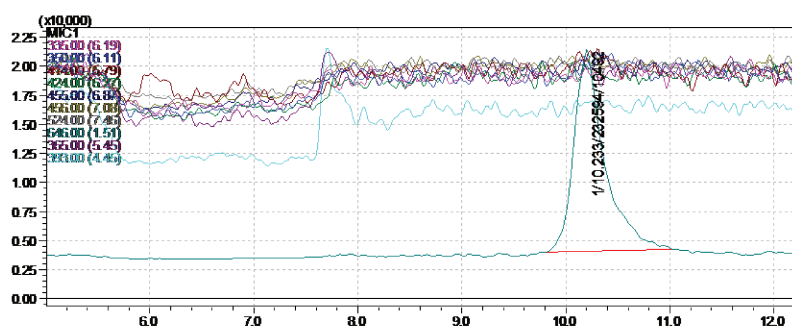


Figura 9 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo cefoperazone ($m/z=646$; $Tr=10,23$),

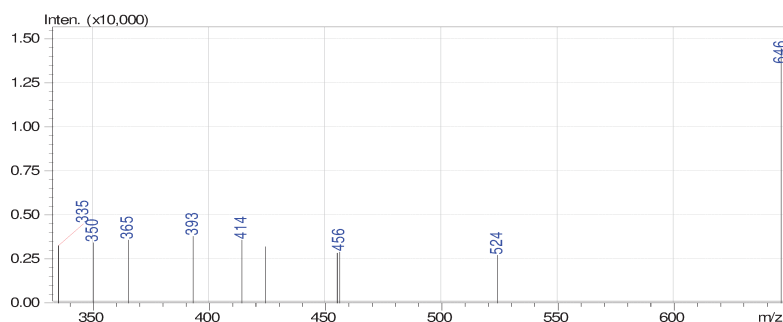


Figura 10 Espectro de massas do padrão no Modo positivo cefoperazone ($m/z=646$; $Tr=10,23$),

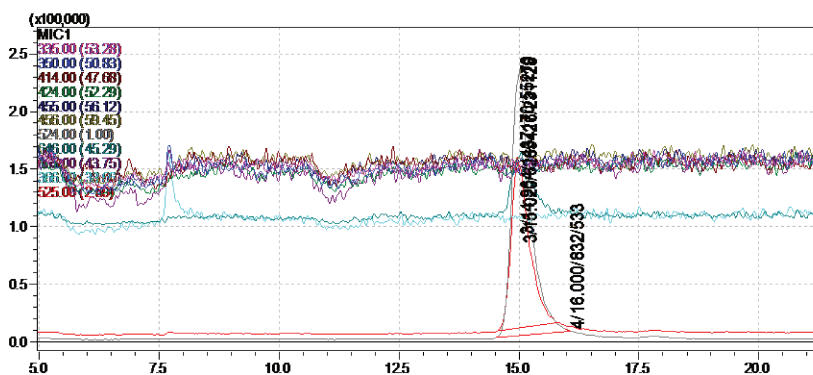


Figura 11 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo ceftiofur ($m/z=524$ e 525 ; $Tr=15,05$),

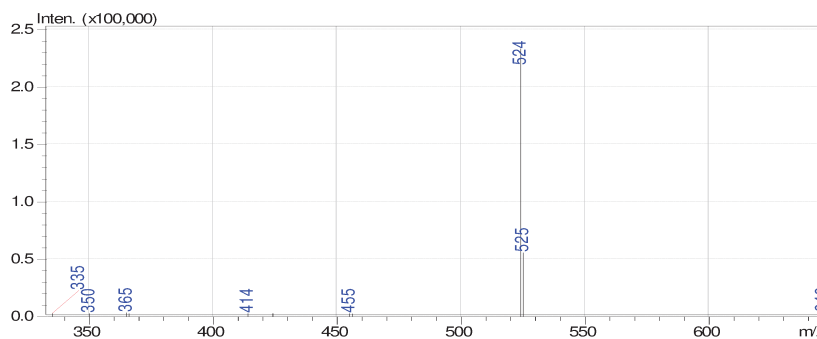


Figura 12 Espectro de massas do padrão no Modo positivo ceftiofur ($m/z=524$ e 525 ; $Tr=15,05$),

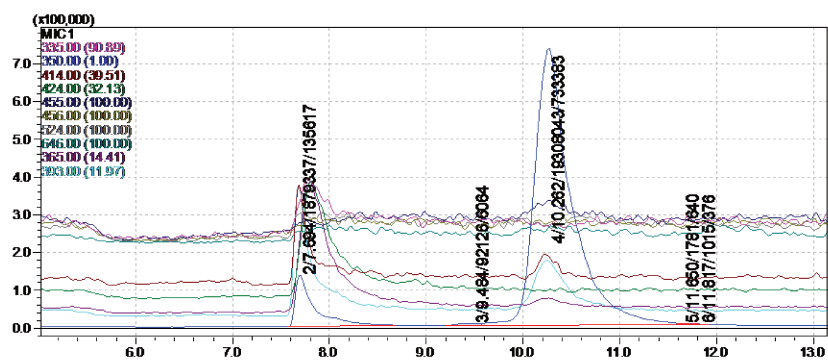


Figura 13 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo ampicilina ($m/z=350$; $Tr=10,35$),

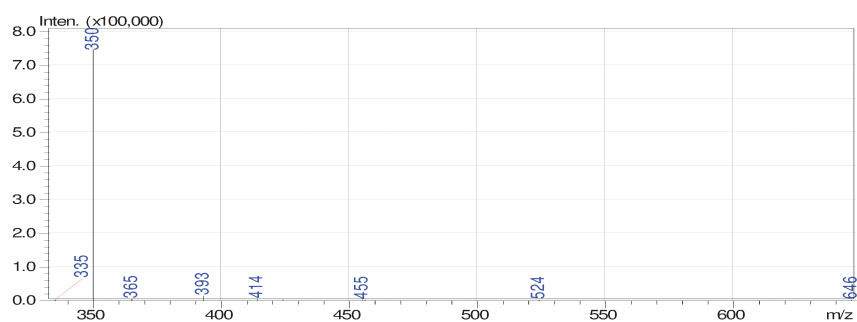


Figura 14 Espectro de massas do padrão no Modo positivo ampicilina ($m/z=350$; $Tr=10,35$).

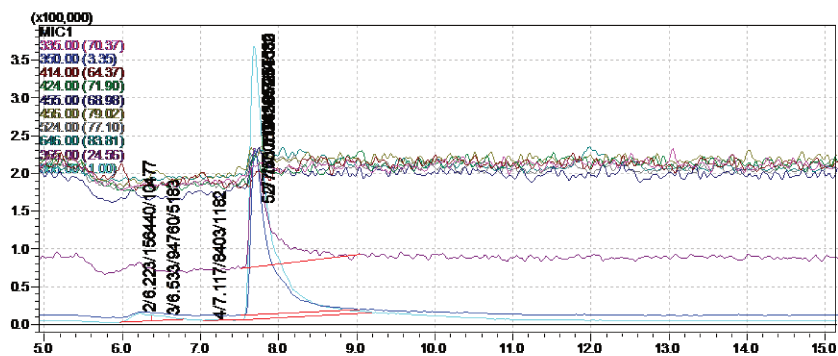


Figura 15 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo amoxicilina ($m/z=350$, 365 e 366 ; $Tr=7,65$).

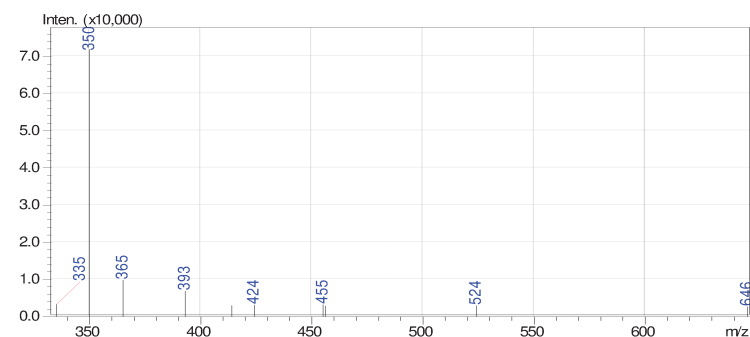


Figura 16 Espectro de massas do padrão no Modo positivo amoxicilina ($m/z=350$, 365 e 366 ; $Tr=7,65$).

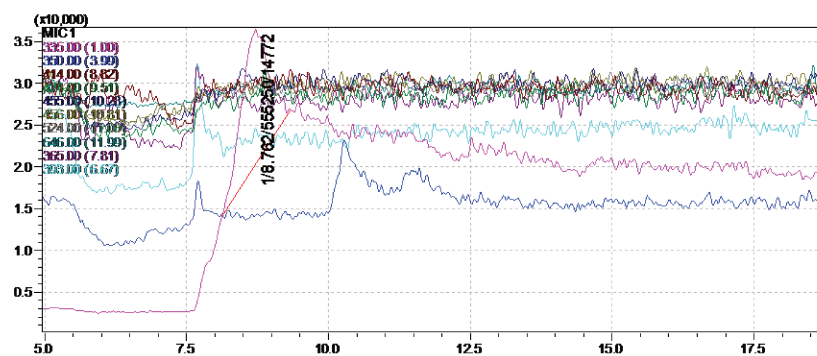


Figura 17 Perfil cromatográfico do padrão no Modo positivo penicilina-G ($m/z=335$; $Tr=8,76$).

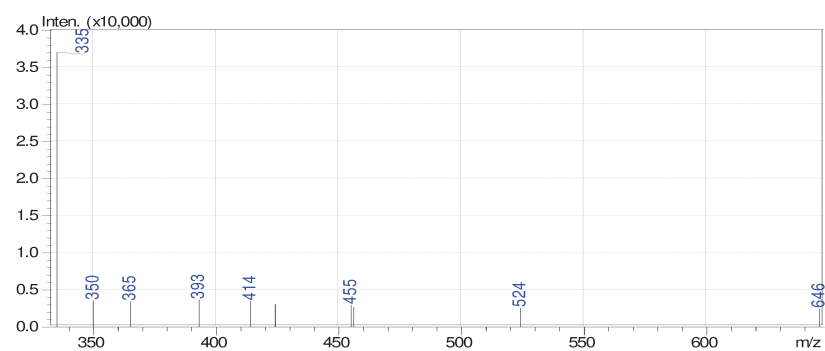


Figura 18 Espectro de massas do padrão no Modo positivo penicilina-G ($m/z=335$; $Tr=8,76$).

ANEXO II

Cromatogramas e Espectros de Massas de B-Lactâmicos Modo Negativo Padrões Individuais

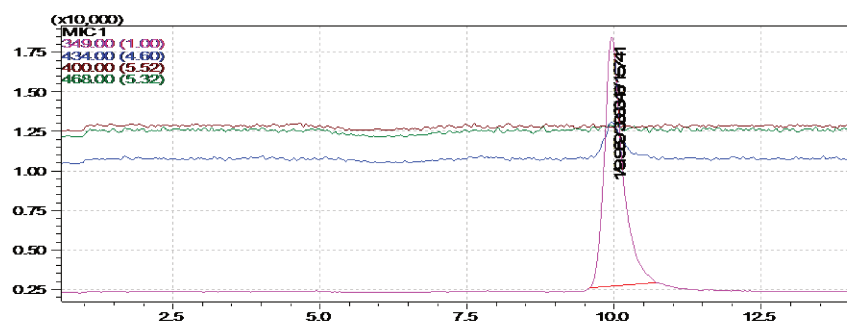


Figura 1 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo penicilina-V ($m/z=349$ e 434 ; $Tr=9,96$).

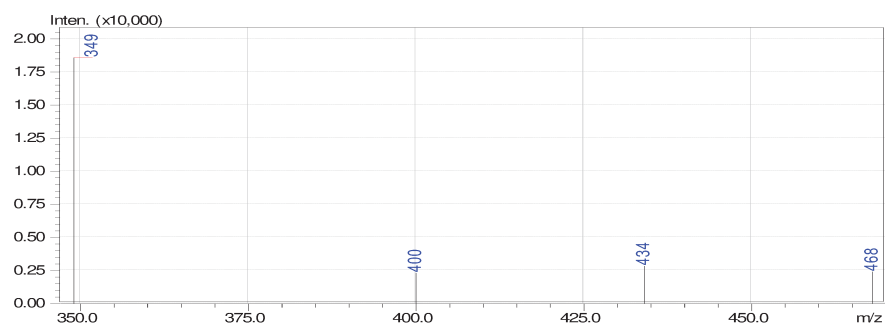


Figura 2 Espectro de massas do padrão no Modo negativo penicilina-V ($m/z=349$ e 434 ; $Tr=9,96$)

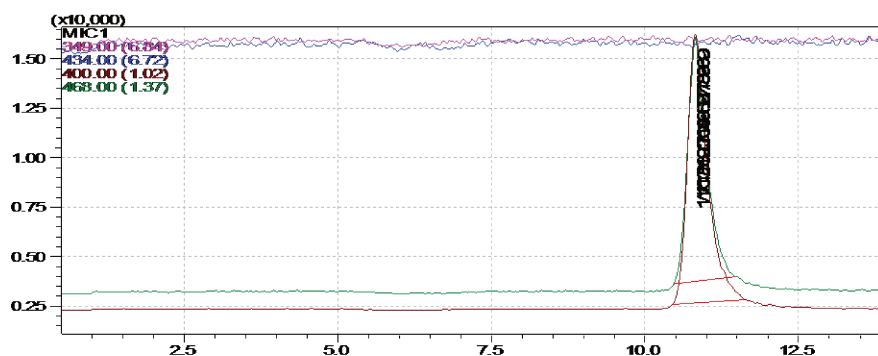


Figura 3 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo oxacilina ($m/z=400$ e 468 ; $Tr=10,82$).

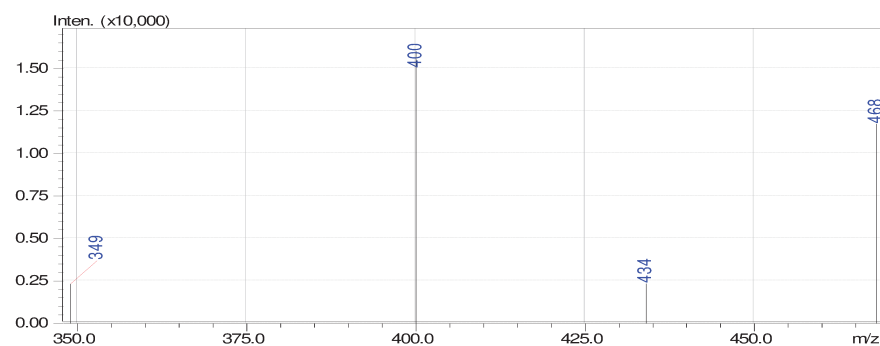


Figura 4 Espectro de massas do padrão no Modo negativo oxacilina ($m/z=400$ e 468 ; $Tr=10,82$)

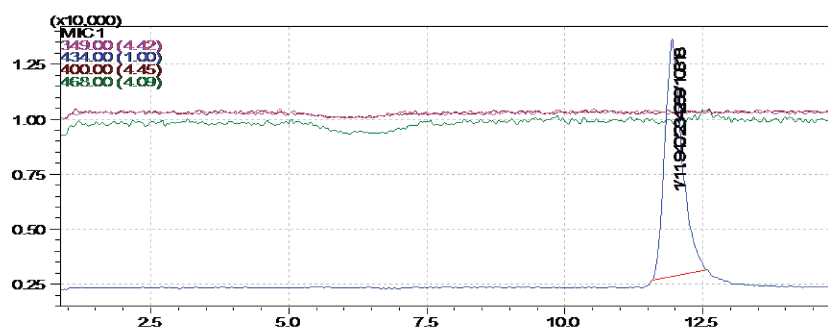


Figura 5 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo cloxacilina ($m/z=434$; $Tr=11,94$).

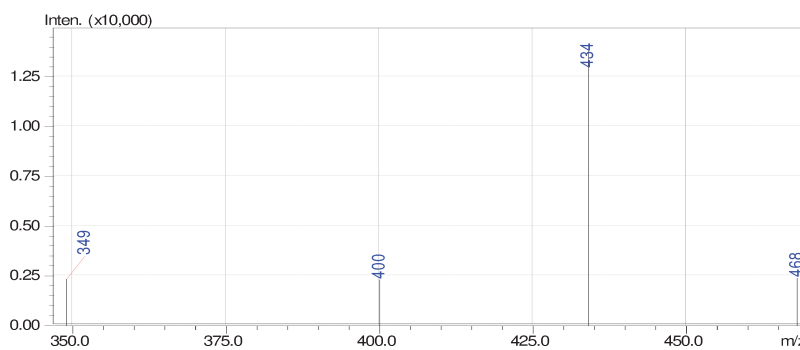


Figura 6 Espectro de massas do padrão no Modo negativo cloxacilina ($m/z=434$; $Tr=11,94$).

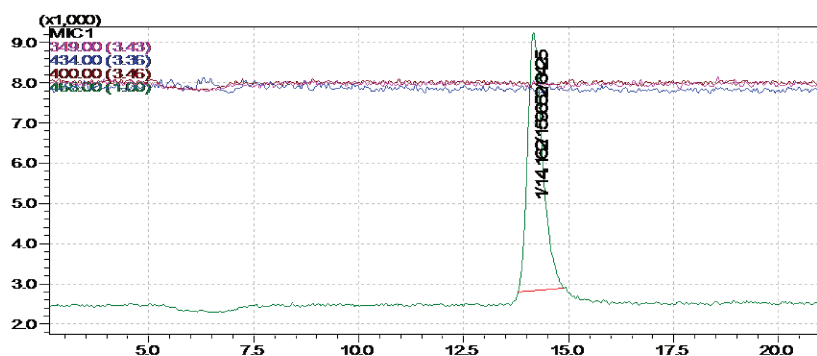


Figura 7 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo dicloxacilina ($m/z=468$; $Tr=14,16$).

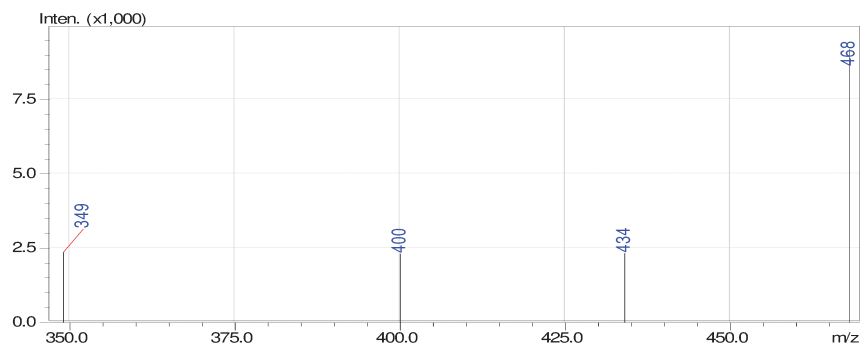


Figura 8 Espectro de massas do padrão no Modo negativo dicloxacilina ($m/z=468$; $TR=14,16$).

ANEXO III

Cromatogramas e Espectros de Massas dos Anfecicóis Modo Positivo Padrões Individuais

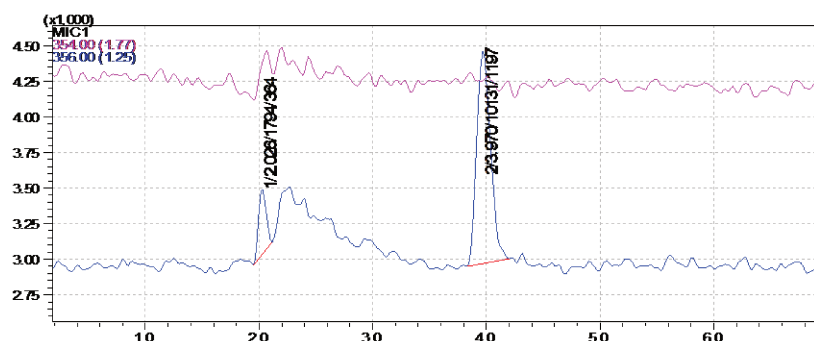


Figura 1 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo florfenicol ($m/z=400$; $Tr=3,97$).

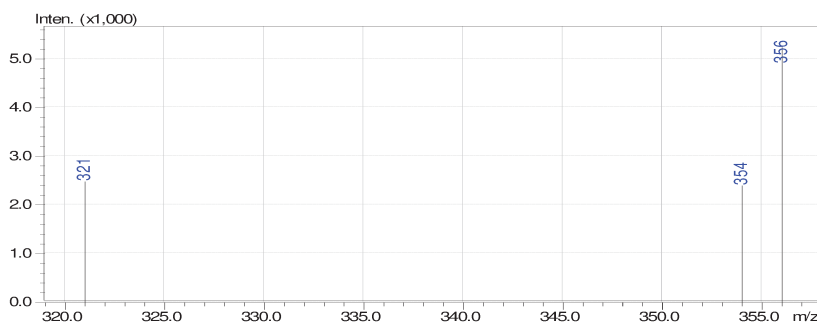


Figura 2 Espectro de massas do padrão no Modo negativo florfenicol ($m/z=400$ $Tr=3,97$).

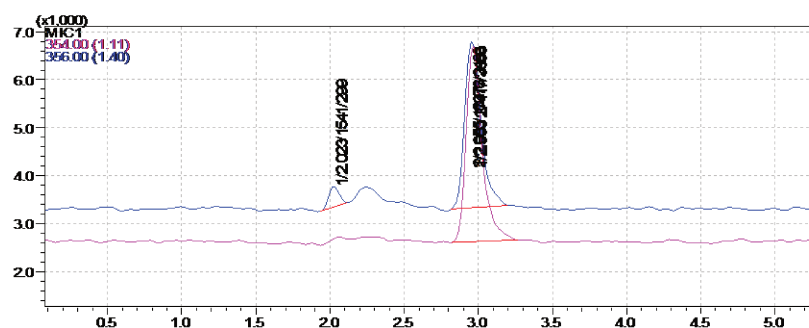


Figura 3 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo tianfenicol ($m/z=354$ e 356 ; $Tr=2,96$).

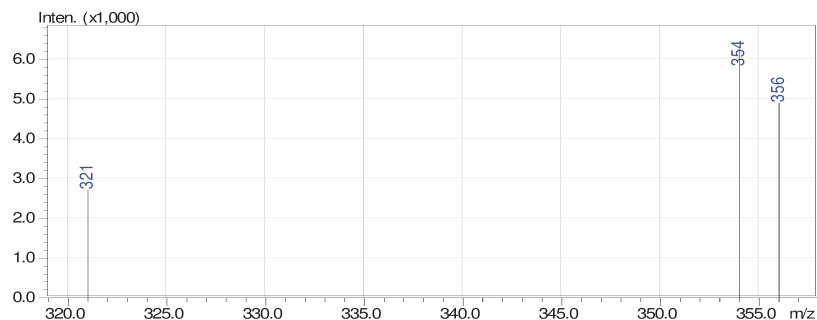


Figura 4 Espectro de massas do padrão no Modo negativo tianfenicol ($m/z=354$ e 356 ; $Tr=2,96$).

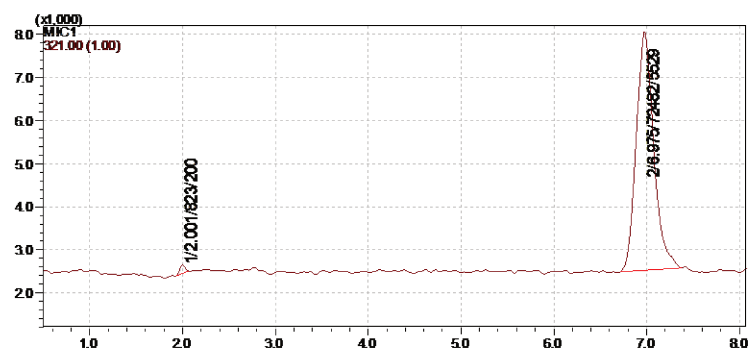


Figura 5 Perfil cromatográfico do padrão no Modo negativo cloranfenicol ($m/z=321$; $Tr=6,97$).

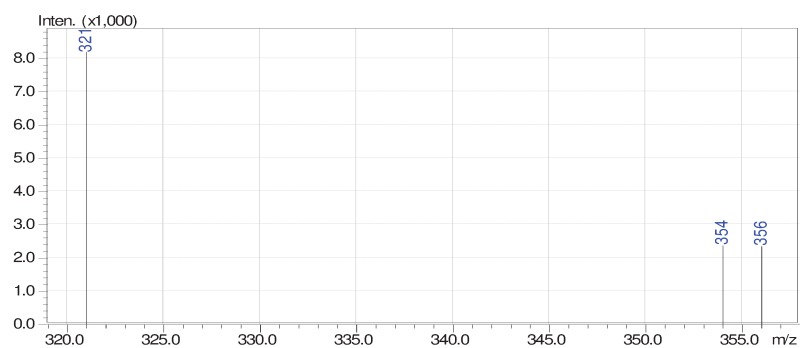


Figura 6 Espectro de massas do padrão no Modo negativo cloranfenicol ($m/z=321$; $Tr=6,97$).