



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

***RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM PEIXE:  
DEPLEÇÃO RESIDUAL E DESENVOLVIMENTO DE  
MÉTODOS ANALÍTICOS***

Tese de doutorado apresentada por Jonas Augusto Rizzato Paschoal ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**CAMPINAS/SP**

Dezembro 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

P262r	<p>Paschoal, Jonas Augusto Rizzato. Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos / Jonas Augusto Rizzato Paschoal. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.</p> <p>Orientadora: Susanne Rath.</p> <p>Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. HPLC-FL. 2. LC-MS/MS. 3. Antimicrobianos. 4. Peixe. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Título em inglês:** Antimicrobials residues in fish: residual depletion and development of analytical methods

**Palavras-chaves em inglês:** HPLC-FL, LC-MS/MS, Antimicrobials, Fish

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Susanne Rath (orientadora), João Palermo Neto (FMVZ-USP), Marili Villa Nova Rodrigues (CPQBA-UNICAMP), Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Carla Beatriz Grespan Bottoli (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 21/12/2007

*Dedico este trabalho,*

*Em memória aos meus pais Jonas e Celina Joseth.*

*A minha amada tia Gracinda, por todo amor, carinho, atenção e  
incomparável generosidade.*

*Aos meus amados irmãos Eduardo, Marcos, Denise e Zico,  
por todo o amor que me proporcionam, e que, juntamente com suas  
filhas Victória, Maria Fernanda, Maria Eduarda e Maria Olívia,  
enriquecem a minha vida.*

*E a você, Daniela, por todo amor, apoio e compreensão de  
sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Susanne Rath, pelo aceite em me orientar, pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela atenção, paciência, incentivo e pela imensurável competência. Também lhe agradeço pela generosa amizade. Suas qualidades nos inspiram a sempre querermos ser melhores como profissionais e como pessoas.

À Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Instituto de Química, por todo o suporte de infra-estrutura disponibilizado para a realização deste trabalho;

Às agências de fomento à pesquisa CNPq e FAPESP, respectivamente, pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio pesquisa concedidos;

Ao Prof. Dr. Felix Reyes pela amizade e atenção;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Prof. José Eurico Possebon Cyrino e a seus orientados, em especial ao Álvaro J. Bicudo, pelo auxílio na condução do experimento com os peixes;

Aos meus amigos e colegas de trabalho Larissa, Keity, Lúcia, Eduardo, Raquel, Francieli, Socorro, Natália, Patrícia e Leandro;

Especial agradecimento ao Ricardo M. Orlando pelo companheirismo, valiosas sugestões, e inestimável amizade;

Aos grandes amigos “vizinhos” de laboratório: Fábio, Leonardo, Rúbia, Cris, Heloísa e Paulo, Márcia, Marilene, Melissa, Rafael e César;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

# CURRICULUM VITAE

Nome: Jonas Augusto Rizzato Paschoal  
e-mail: [jonaspaschoal@yahoo.com.br](mailto:jonaspaschoal@yahoo.com.br)  
currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/3099044430035756>

## Formação acadêmica

- 1995-1999      **Graduação** em Engenharia Agrônoma. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, Brasil.
- 2000-2003      **Mestrado** em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, Brasil.  
*Título:* Padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir de anticorpos policlonais produzidos contra progesterona.  
*Orientador:* Prof. Dr. Cyro Ferreira Meirelles.  
*Bolsista:* Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
- 2003-2007      **Doutorado** em Química Analítica. Instituto de Química/Unicamp, IQ/UNICAMP, Brasil.  
*Título:* Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos.  
*Orientadora:* Profa. Dra. Susanne Rath.  
*Bolsista:* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

## Artigos em revista científica indexada

- PASCHOAL, J.A.R.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de contaminantes em alimentos. **Química Nova**. No prelo, 2007.
- PASCHOAL, J.A.R.; CODOGNOTO, L.; WINTER, E.; SUFFREDINI, H.; RATH, S. Electrochemical behavior of dopamine at a 3,3-dithiodipropionic acid self-assembled monolayers. **Talanta**, v.72, p.472-733, 2007.
- DUARTE, K.M.R.; PASCHOAL, J.A.R.; GOMES, L.H. Imunoensaios e zootecnia: aplicações práticas. **Boletim de Indústria Animal**, v.63, p.121-130, 2006.
- DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; PASCHOAL, J.A.R.; MEIRELLES, C.F. A fast immunoassay for the screening of alfa-trembolone in bovine urine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.74-79, 2006.
- PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; MEIRELLES, C.F. Padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir de anticorpos policlonais produzidos contra progesterona. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.84-92, 2004.

## Apresentação de trabalhos em eventos científicos

- PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Method validation for the determination of quinolones in fish by HPLC-FL and identity confirmation by LC-ESI-MS/MS Q-Tof. In: 31st

- International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2007. Ghent, Bélgica, p.803-803.
- PASCHOAL, J.A.R.; SISMOTTO, M.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Development of a LC-ESI-MS/MS Q-ToF method for the determination of quinolones in fish. In: 31st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2007. Ghent, Bélgica, p.804-804.
  - PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Desenvolvimento de método HPLC-Fluorescência para a determinação de ácido oxolínico em peixe. In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO), 2006, São Pedro/SP, p.105-105.
  - PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F.G.R.; RATH, S. Desenvolvimento de método HPLC-Fluorescência para determinação de multi-resíduos de quinolonas em peixe. In: II Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO), 2006, São Pedro/SP, p.106-106.
  - CODOGNOTO, L.; WINTER, E.; PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Eletrodos de ouro modificados por SAM aplicados à determinação de dopamina em medicamentos. In: 13<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2005, Niterói/RJ.
  - WINTER, E.; SPIADORIN, C.G.; PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Determinação de dopamina em fármacos por FIA com detecção espectrofotométrica. In: 13<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2005, Niterói/RJ.
  - SILVA, R.G.; PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Determinação de resíduos de enrofloxacina e ciprofloxacina em tecidos de frango. In: X CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOLOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS - COLACRO, 2004, Campos do Jordão/SP.

# RESUMO

## RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM PEIXE: DEPLEÇÃO RESIDUAL E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os antimicrobianos são largamente empregados na medicina veterinária, e resíduos destes podem permanecer nos alimentos de origem animal, acima de valores considerados seguros, quando não são respeitadas as boas práticas veterinárias. Este trabalho teve por objetivos: (i) desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de multi-resíduos de quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, sarafloxacina, ácido oxolínico e flumequina) em carne de peixe, usando a cromatografia líquida de alta eficiência associada a detecção por fluorescência (HPLC-FL) e cromatografia líquida associada a espectrometria de massas *em tandem* por interface de ionização por electrospray e (LC-ESI-MS/MS Q-ToF); (ii) desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de oxitetraciclina (OTC) em ração e carne de tilápias por HPLC-DAD e HPLC-FL, respectivamente e (iii) realizar um ensaio com tilápias (*Oreochromis niloticus*) para avaliar a depleção da OTC na carne desses peixes.

De modo geral, a extração das quinolonas e da OTC da carne de peixes foi conduzida por extração sólido líquido seguida da limpeza do extrato em cartuchos de extração em fase sólida. A separação cromatográfica dos antimicrobianos foi realizada em coluna de fase reversa octadecil híbrida.

Os métodos foram validados mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, precisão intra e inter-ensaios e exatidão. Para o método LC-MS/MS foi também avaliado o efeito matriz. Todos os métodos foram considerados adequados aos objetivos propostos neste trabalho.

Para avaliar a depleção de OTC na carne de tilápias, os peixes (peso médio de 93 a 115 g) receberam o fármaco via ração na dose de 80 mg OTC/kg peso vivo/dia, por cinco dias consecutivos. A temperatura da água durante o ensaio variou de 16,5 a 24,5 °C. A curva de depleção se ajustou a um modelo exponencial de primeira ordem. O tempo de meia vida de eliminação foi de 2,5 dias e o período de carência estimado foi de 5 dias.

**Palavras chave:** HPLC-FL, LC-MS/MS, antimicrobianos, peixe.

# ABSTRACT

## ANTIMICROBIAL RESIDUES IN FISH: RESIDUAL DEPLETION AND DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS

Antimicrobials are widely employed in veterinary medicine, and their residues could remain in food of animal origin above values considered safe if good veterinary practices are not followed. The aim of this work is to address (i) the development and validation of analytical methods using high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL) and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS Q-Tof) for the determination of multi residues of quinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin, oxolinic acid and flumequine) in fish; (ii) the development and validation of analytical methods for the determination of oxytetracycline (OTC) in fish feed and tilapia fish fillets using HPLC-DAD and HPLC-FL, respectively, and (iii) the study of tilapias (*Oreochromis niloticus*) in order to evaluate the depletion of OTC from the fish fillet.

In general, the extraction of the quinolones and OTC from the fish matrix was conducted by solid-liquid extraction followed by clean-up on solid phase extraction cartridges. The antimicrobials chromatographic separation was performed on a reverse phase octadecyl hybrid column.

The methods were validated through the following parameters: linear range, linearity, sensitivity, selectivity, detection limit, quantitation limit, intra- and inter-assay precision and accuracy. For the LC-MS/MS method, the matrix effect was also evaluated. All methods were adequate to the proposed objectives.

In order to evaluate the depletion of OTC in the tilapia fillets, the fish (weight range 93 – 115 g) were given medicated feed in a concentration of 80 mg OTC/kg body weight/day for five consecutive days. The water temperature was between 16.5 to 24.5 °C during the treatment. The depletion curve was fitted to an exponential first order model. The elimination half-life was 2.5 days and the withdrawal period was estimated as five days.

**Key words:** HPLC-FL, LC-MS/MS, antimicrobials, fish.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
PREFÁCIO	1
CAPÍTULO I	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
I.1. Introdução	5
I.2. A aqüicultura nacional	6
I.3. Antimicrobianos na aqüicultura	8
I.4. Segurança alimentar	10
I.5. Legislação nacional e inspeção	12
I.6. Quinolonas e tetraciclínas	13
I.7. Métodos analíticos para a determinação de antimicrobianos em carne de peixe	16
<i>I.7.1. Quinolonas</i>	17
<i>I.7.2. Tetraciclínas</i>	22
I.8. Validação analítica	26
<i>I.8.1. Seletividade</i>	27
<i>I.8.2. Efeito matriz</i>	28
<i>I.8.3. Curva analítica, linearidade e sensibilidade</i>	29
<i>I.8.4. Limite de detecção (LOD)</i>	30
<i>I.8.5. Limite de quantificação (LOQ)</i>	31
<i>I.8.6. Precisão</i>	32
<i>I.8.7. Exatidão</i>	33
<i>I.8.8. Robustez</i>	33
CAPÍTULO II	35
OBJETIVOS	

<b>CAPÍTULO III</b>	39
<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE MULTI-RESÍDUOS DE QUINOLONAS POR HPLC-FL E LC-MS/MS</b>	
<b>III.1. Introdução</b>	41
<b>III.2. Objetivos</b>	42
<b>III.3. Parte experimental</b>	42
<b><i>III.3.1. Equipamentos</i></b>	42
<b><i>III.3.2. Colunas cromatográficas</i></b>	43
<b><i>III.3.3. Cartuchos de extração em fase sólida</i></b>	44
<b><i>III.3.4. Solventes e reagentes</i></b>	44
<b><i>III.3.5. Preparo de soluções</i></b>	44
<b><i>III.3.5.1. <u>Soluções estoques</u></i></b>	44
<b><i>III.3.5.2. <u>Soluções de trabalho</u></i></b>	45
<b><i>III.3.6. Amostras branco de peixe</i></b>	45
<b>III.4. Procedimento Analítico</b>	45
<b><i>III.4.1. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL</i></b>	45
<b><i>III.4.1.1. <u>Desenvolvimento do método cromatográfico</u></i></b>	45
<b><i>III.4.1.2. <u>Preparo de amostra de carne de peixe</u></i></b>	47
<b><i>III.4.1.3. <u>Validação do método analítico</u></i></b>	49
<b><i>III.4.1.3.1. <u>Seletividade</u></i></b>	49
<b><i>III.4.1.3.2. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u></i></b>	50
<b><i>III.4.1.3.3. <u>Limite de Detecção (LOD)</u></i></b>	51
<b><i>III.4.1.3.4. <u>Limite de Quantificação (LOQ)</u></i></b>	51
<b><i>III.4.1.3.5. <u>Precisão</u></i></b>	51
<b><i>III.4.1.3.6. <u>Exatidão</u></i></b>	52
<b><i>III.4.2. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por LC-MS/MS</i></b>	52
<b><i>III.4.2.1. <u>Desenvolvimento do método cromatográfico</u></i></b>	52
<b><i>III.4.2.2. <u>Preparo de amostra de carne de peixe</u></i></b>	53
<b><i>III.4.2.3. <u>Validação do método analítico</u></i></b>	53
<b>III.5. Resultados e Discussão</b>	54

<b>5.1. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL</b>	54
<b><u>III.5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico</u></b>	55
III.5.1.1.1. <u>Detecção por fluorescência</u>	55
III.5.1.1.2. <u>Fase estacionária</u>	57
III.5.1.1.3. <u>Fase móvel</u>	58
<b><u>III.5.1.2. Preparo de amostra de carne de peixe</u></b>	64
<b><u>III.5.1.3. Validação do método analítico</u></b>	69
III.5.1.3.1. <u>Seletividade</u>	70
III.5.1.3.2. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u>	70
III.5.1.3.3. <u>Limite de Detecção (LOD)</u>	74
III.5.1.3.4. <u>Limite de Quantificação (LOQ)</u>	74
III.5.1.3.5. <u>Precisão</u>	74
III.5.1.3.6. <u>Exatidão</u>	75
<b>III.5.2. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por LC-MS/MS</b>	76
<b><u>III.5.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico</u></b>	76
III.5.2.1.1. <u>Condições de detecção por MS</u>	77
III.5.2.1.2. <u>Fases estacionária e móvel</u>	80
<b><u>III.5.2.2. Preparo de amostra de carne de peixe</u></b>	83
<b><u>III.5.2.3. Validação do método analítico</u></b>	83
III.5.2.3.1. <u>Seletividade</u>	83
III.5.2.3.2. <u>Efeito matriz</u>	84
III.5.2.3.3. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u>	84
III.5.2.3.4. <u>Limite de Detecção (LOD)</u>	88
III.5.2.3.5. <u>Limite de Quantificação (LOQ)</u>	88
III.5.2.3.6. <u>Precisão</u>	88
III.5.2.3.7. <u>Exatidão</u>	89
<b>III.6. Conclusões</b>	90
<b>CAPÍTULO IV</b>	93
<b>AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO DE OXITETRACICLINA NA CARNE DE TILÁPIAS APÓS MEDICAÇÃO VIA RAÇÃO</b>	
<b>IV.1. Introdução</b>	95

IV.2. Objetivos	96
IV.3. Parte experimental	96
IV.3.1. Equipamentos	96
IV.3.2. Coluna cromatográfica	97
IV.3.3. Cartuchos de extração em fase sólida	97
IV.3.4. Solventes e reagentes	97
IV.3.5. Preparo de soluções	97
IV.3.5.1. <u>Soluções estoques</u>	97
IV.3.5.2. <u>Soluções de trabalho</u>	98
IV.3.6. Planejamento do Ensaio para Estudo de Depleção de OTC na Carne de Tilápias	98
IV.3.6.1. <u>Medicamento</u>	98
IV.3.6.2. <u>Ração</u>	99
IV.3.6.3. <u>Preparo da ração adicionada de OTC</u>	101
IV.3.6.4. <u>Ensaio com as tilápias</u>	102
IV.3.6.5. <u>Coleta da carne de peixe</u>	107
IV.4. Procedimento analítico	110
IV.4.1. Método para a determinação de OTC na ração	110
IV.4.1.1. <u>Desenvolvimento do método cromatográfico</u>	110
IV.4.1.2. <u>Preparo da amostra de ração</u>	110
IV.4.1.3. <u>Validação do método analítico</u>	112
IV.4.1.3.1. <u>Seletividade</u>	112
IV.4.1.3.2. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u>	112
IV.4.1.3.3. <u>Precisão</u>	113
IV.4.1.3.4. <u>Exatidão</u>	113
IV.4.2. Método para a determinação de OTC na carne de peixe	113
IV.4.2.1. <u>Desenvolvimento do método cromatográfico</u>	113
IV.4.2.2. <u>Preparo de amostra de carne de peixe</u>	114
IV.4.2.3. <u>Validação do método analítico</u>	116
IV.4.2.3.1. <u>Seletividade</u>	116
IV.4.2.3.2. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u>	116
IV.4.2.3.3. <u>Limite de Detecção (LOD)</u>	117
IV.4.2.3.4. <u>Limite de Quantificação (LOQ)</u>	117
IV.4.2.3.5. <u>Precisão</u>	117

IV.4.2.3.6. <u>Exatidão</u>	118
<b>IV.5. Resultados e Discussão</b>	<b>118</b>
<b>IV.5.1. Método para a determinação de OTC na ração</b>	<b>118</b>
<b>IV.5.1.1. <u>Desenvolvimento do método cromatográfico</u></b>	<b>118</b>
<b>IV.5.1.2. <u>Preparo da amostra de ração</u></b>	<b>121</b>
<b>IV.5.1.3. <u>Validação do método analítico</u></b>	<b>121</b>
IV.5.1.3.1. <u>Seletividade</u>	121
IV.5.1.3.2. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u>	123
IV.5.1.3.3. <u>Precisão</u>	124
IV.5.1.3.4. <u>Exatidão</u>	124
<b>IV.5.1.4. <u>Análise da ração adicionada de OTC</u></b>	<b>126</b>
<b>IV.5.2. Método para a determinação de OTC na carne de peixe</b>	<b>126</b>
<b>IV.5.2.1. <u>Desenvolvimento do método cromatográfico</u></b>	<b>126</b>
<b>IV.5.2.2. <u>Preparo da amostra de carne de peixe</u></b>	<b>134</b>
<b>IV.5.2.3. <u>Validação do método analítico</u></b>	<b>137</b>
IV.5.2.3.1. <u>Seletividade</u>	137
IV.5.2.3.2. <u>Curva analítica, linearidade e sensibilidade</u>	137
IV.5.2.3.3. <u>Limite de Detecção (LOD)</u>	138
IV.5.2.3.4. <u>Limite de Quantificação (LOQ)</u>	139
IV.5.2.3.5. <u>Precisão</u>	139
IV.5.2.3.6. <u>Exatidão</u>	139
<b>IV.5.3. Estudo de depleção de OTC na carne de tilápias</b>	<b>141</b>
<b>IV.5.3.1. <u>Análises das amostras das tilápias do ensaio</u></b>	<b>141</b>
<b>IV.5.3.2. <u>Avaliação da depleção de OTC na carne de tilápias</u></b>	<b>143</b>
<b>IV.6. Conclusões</b>	<b>147</b>
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>149</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN:	acetonitrila
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
AOX:	ácido oxolínico
ATCA:	ácido tricloroacético
ATFA:	ácido trifluoroacético
C <sub>18</sub> :	coluna cromatográfica de fase estacionária reversa octadecil
CIP:	ciprofloxacina
CVMP:	Comitê para Produtos Medicinais de Uso Veterinário ( <i>Committee for Medicinal Products for Veterinary Use</i> )
DAD:	detecção por arranjo de diodos
DAN:	danofloxacina
EC:	Comissão Européia ( <i>European Commission</i> )
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EMA:	Agência Européia de Medicinas ( <i>European Medicines Agency</i> )
ENR:	enrofloxacina
ESI:	ionização por eletrospray ( <i>electrospray ionization</i> )
FA:	fase aquosa
FAO:	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura ( <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FDA:	Administração de Drogas e Alimentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FE:	fase estacionária
FL:	detecção por fluorescência
FLM:	flumequina
FM:	fase móvel
FO:	fase orgânica
HAc:	ácido acético
HPLC:	cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
ICH:	Conferência Internacional de Harmonização ( <i>International Conference on Harmonization</i> )
IDA:	ingetão diária aceitável
INMETRO:	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO:	Organização Internacional para Padronização ( <i>International Organization in Standardization</i> )
IUPAC:	União Internacional de Química Pura e Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
JECFA:	Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares ( <i>Joint Expert Committee on Food Additives</i> )
LC:	cromatografia líquida ( <i>liquid chromatography</i> )

LLE:	extração líquido-líquido ( <i>liquid-liquid extraction</i> )
LMR:	limite máximo de resíduo
LOD:	limite de detecção
LOQ:	limite de quantificação
LSE:	extração sólido-líquido ( <i>solid-liquid extraction</i> )
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
MeOH:	metanol
MRC:	material de referência certificado
MS:	espectrometria de massas ( <i>mass spectrometry</i> )
MS/MS:	espectrometria de massas em tandem ( <i>mass spectrometry in tandem</i> )
NOR:	norfloxacin
OECD:	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico ( <i>Organisation for Economic Co-Operation and Development</i> )
OTC:	oxitetraciclina
PAMVet:	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo do Brasil
PNCRA:	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal do Brasil
Q:	quadrupolo
QA:	quinolonas ácidas
QP:	quinolonas 7-piperazinil
QQQ:	triplo quadrupolo
SAR:	sarafloxacin
SPE:	extração em fase sólida ( <i>solid phase extraction</i> )
ToF:	tempo de voo ( <i>time of flight</i> )
UV:	espectro de ondas eletromagnéticas da região do ultravioleta
Vis:	espectro de ondas eletromagnéticas da região do visível
WHO:	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

# LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I</b>		<b>Página</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>		
<b>Tabela I.1</b> - Relação dos LMR de alguns antimicrobianos de uso na piscicultura (EMEA, 2007).		11
<b>Tabela I.2</b> - Procedimentos para determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC.		21
<b>Tabela I.3</b> - Procedimentos para determinação de tetraciclinas em carne de peixe por HPLC.		25
<b>CAPÍTULO III</b>		
<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE MULTI-RESÍDUOS DE QUINOLONAS POR HPLC-FL E LC-MS/MS</b>		
<b>Tabela III.1</b> - Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros cromatográficos.		46
<b>Tabela III.2</b> - Níveis de fortificação empregados para obtenção das curvas analíticas para quantificação das quinolonas, empregando a NOR como padrão interno.		50
<b>Tabela III.3</b> - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.		64
<b>Tabela III.4</b> - Eficiências de extração das quinolonas no teste inicial de preparo de amostra.		65
<b>Tabela III.5</b> - Eficiências de extração das quinolonas com eluição básica.		66
<b>Tabela III.6</b> - Eficiências de extração das quinolonas com o aumento da polaridade da solução extratora.		66
<b>Tabela III.7</b> - Eficiências de extração das quinolonas com a diminuição da polaridade da solução extratora.		67
<b>Tabela III.8</b> - Eficiências de extração das quinolonas em função da quantidade de amostra empregada.		68
<b>Tabela III.9</b> - Eficiências de extração das quinolonas em função do cartucho SPE.		68
<b>Tabela III.10</b> - Parâmetros de validação do método de determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL.		76

<b>Tabela III.11</b> - Íons de quantificação e de identificação das quinolonas, e os respectivos erros de exatidão entre as razões m/z teóricas e experimentais.	79
<b>Tabela III.12</b> - Parâmetros de validação do método de determinação de quinolonas em carne de peixe por LC-MS/MS Q-ToF.	90

## CAPÍTULO IV

### AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO DE OXITETRACICLINA NA CARNE DE TILÁPIAS APÓS MEDICAÇÃO VIA RAÇÃO

<b>Tabela IV.1</b> - Composição do produto comercial Terramicina em pó solúvel com Antigerm 77 (Pfizer Ltda.).	99
<b>Tabela IV.2</b> - Composição das rações comerciais utilizadas no ensaio com as tilápias.	100
<b>Tabela IV.3</b> - Medidas de peso (n=10), comprimentos totais (CT) e padrões (CP) dos peixes no início do ensaio.	106
<b>Tabela IV.4</b> - Parâmetros físico-químicos da água dos tanques durante o ensaio.	107
<b>Tabela IV.5</b> - Medidas de peso e comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) dos peixes logo após o abate.	109
<b>Tabela IV.6</b> - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.	121
<b>Tabela IV.7</b> - Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para determinação de OTC na ração por HPLC-DAD (380 nm).	125
<b>Tabela IV.8</b> - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.	134
<b>Tabela IV.9</b> - Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para determinação de OTC em carne de tilápia por HPLC-FL.	140
<b>Tabela IV.10.</b> Dados de concentração média de OTC obtidas das análises em duplicatas nas carnes das tilápias do ensaio.	142
<b>Tabela IV.11.</b> Concentração de OTC na carne de tilápia alimentadas com ração medicada com OTC (80 mg de OTC/kg PV/dia) durante 5 dias.	143

# LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I</b>		<b>Página</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>		
<b>Figura I.1</b> - Estrutura molecular das quinolonas.		14
<b>Figura I.2</b> - Estrutura molecular das tetraciclinas.		15
<b>Figura I.3</b> - Equilíbrio ácido-base para as quinolonas.		18
<b>Figura I.4</b> - Equilíbrio ácido-base para a oxitetraciclina.		23
<b>CAPÍTULO III</b>		
<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE MULTI-RESÍDUOS DE QUINOLONAS POR HPLC-FL E LC-MS/MS</b>		
<b>Figura III.1</b> - Esquema geral da etapa de preparo de amostra para extração da quinolonas de carne de peixe.		48
<b>Figura III.2</b> - Estruturas moleculares das quinolonas estudadas.		55
<b>Figura III.3</b> - Cromatogramas da separação de quinolonas NOR, CIP, DAN, ENR e AOX (todas a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sob monitoração por (a) fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ : 325/450 nm); e (b) DAD: 279,2 nm.		56
<b>Figura III.4</b> - Cromatogramas da separação da CIP e do AOX (ambos a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): (a) LiChroCART 125 x 4 mm, $5 \mu\text{m}$ (Merck, Alemanha); (b) XTerra-A: 250 x 4 mm, $5 \mu\text{m}$ (Waters, EUA).		60
<b>Figura III.5</b> - Cromatogramas característicos para (a) amostra branco e (b) amostra branco fortificada com NOR, CIP, ENR, AOX (todas a $200 \text{ ng g}^{-1}$ ), DAN ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ), SAR ( $60 \text{ ng g}^{-1}$ ) e FLM ( $400 \text{ ng g}^{-1}$ ).		61
<b>Figura III.6</b> - Cromatogramas característicos para (a) amostra branco e (b) amostra branco fortificada com NOR, CIP, ENR, AOX (todas a $200 \text{ ng g}^{-1}$ ), DAN ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ), SAR ( $60 \text{ ng g}^{-1}$ ) e FLM ( $400 \text{ ng g}^{-1}$ ).		62
<b>Figura III.7</b> - Preparo da amostra de carne de peixe para extração das quinolonas.		69
<b>Figura III.8</b> - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para CIP e DAN obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.		71
<b>Figura III.9</b> - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para ENR e SAR obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.		72

<b>Figura III.10</b> - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para AOX e FLM obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.	73
<b>Figura III.11</b> - Cromatograma característico de amostra branco de carne de peixe fortificada com as quinolonas nos níveis de concentração correspondentes ao nível P4.	81
<b>Figura III.12</b> - Cromatograma característico de amostra branco de carne de peixe.	82
<b>Figura III.13</b> - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para CIP e DAN obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por LC-MS/MS.	85
<b>Figura III.14</b> - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para ENR e SAR obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.	86
<b>Figura III.15</b> - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para AOX e FLM obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas LC-MS/MS.	87

## CAPÍTULO IV

### AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO DE OXITETRACICLINA NA CARNE DE TILÁPIAS APÓS MEDICAÇÃO VIA RAÇÃO

<b>Figura IV.1</b> - Tanque de cultivo das tilápias.	103
<b>Figura IV.2</b> - Gaiolas utilizadas para conter os peixes no ensaio.	104
<b>Figura IV.3</b> - Fotografias da seqüência de procedimentos para a coleta da carne dos peixes.	108
<b>Figura IV.4</b> - Esquema geral do procedimento de extração de OTC na ração.	111
<b>Figura IV.5</b> - Esquema geral do procedimento de extração de OTC em carne de peixe.	115
<b>Figura IV.6</b> - Espectros de absorção no DAD obtidos para OTC e TC na fase móvel selecionada.	119
<b>Figura IV.7</b> - Cromatograma da amostra branco de ração, após o procedimento de extração.	120
<b>Figura IV.8</b> - Cromatograma da separação de OTC ( $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e TC ( $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ) da amostra de ração enriquecida com OTC.	120
<b>Figura IV.9</b> – Curva analítica para da determinação de OTC na ração e o respectivo gráfico de resíduos.	124
<b>Figura IV.10</b> - Cromatograma obtido da amostra branco fortificada com OTC e TC, ambas a $150 \text{ ng g}^{-1}$ .	128

<b>Figura IV.11</b> - Comparação de cromatogramas obtidos da separação de OTC e NOR diluídas em solução aquosa (150 e 25 ng mL <sup>-1</sup> , respectivamente), sob detecção por (a e b) DAD (OTC: 380 nm; e NOR: 270 nm) e (c e d) fluorescência (OTC <sub>λ<sub>exc</sub>/λ<sub>em</sub></sub> : 380/512 nm; e NOR <sub>λ<sub>exc</sub>/λ<sub>em</sub></sub> : 280/450 nm).	130
<b>Figura IV.12</b> - Cromatogramas característicos obtidos (a) da amostra branco de carne de tilápia, e (b) da amostra branco fortificada com OTC (150 ng g <sup>-1</sup> ) e NOR (25 ng g <sup>-1</sup> ) com detecção por fluorescência em 380/512 nm (λ <sub>exc</sub> /λ <sub>em</sub> ).	132
<b>Figura IV.13</b> - Cromatogramas característicos obtidos (a) da amostra branco de carne de tilápia, e (b) da amostra branco fortificada com OTC (150 ng g <sup>-1</sup> ) e NOR (25 ng g <sup>-1</sup> ) com detecção por fluorescência em 280/480 nm (λ <sub>exc</sub> /λ <sub>em</sub> ).	133
<b>Figura IV.14</b> - Curva analítica para quantificação de OTC em carne de peixe, e o respectivo gráfico de resíduos.	138
<b>Figura IV.15.</b> Perfil da curva concentração de OTC em função do tempo (período entre a última administração de OTC e o abate).	144
<b>Figura IV.16.</b> Curva concentração de OTC em função do tempo (período entre a última administração de OTC e o abate).	145
<b>Figura IV.17</b> - Linearização da curva de depleção (ln C vs tempo).	146
<b>Figura IV.18</b> - Gráfico de resíduos.	146

---

---

## PREFÁCIO

---

---

**A** tese versa sobre o desenvolvimento e a validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal, em particular carne de peixe. Os antimicrobianos selecionados foram do grupo das quinolonas e tetraciclinas, que têm sido largamente empregados na produção de alimentos de origem animal em todo mundo. A presença de resíduos de fármacos em alimentos tem sido reavaliada de forma contínua e, para garantir a segurança dos consumidores, é necessário que métodos validados estejam disponíveis para o controle de qualidade destes alimentos.

Considerando o fato de que a produção de peixes requer em determinadas situações o emprego de antimicrobianos para fins profiláticos e/ou terapêuticos, é necessário que se tenha conhecimento da depleção destes fármacos do tecido animal para garantir que o produto final a ser consumido apresente teores destes fármacos abaixo dos valores dos limites máximos de resíduos permitidos.

O que motivou o presente trabalho é a carência de informações no que diz respeito à legislação e ao uso de antimicrobianos destinados à aquicultura no Brasil. Ainda, praticamente existem poucos ensaios realizados com antimicrobianos na piscicultura para o estabelecimento de períodos de carência. Os dados de outros países não devem ser simplesmente extrapolados, uma vez que as condições ambientais são diferenciadas. Neste contexto, faltam estudos e mão de obra qualificada para a realização dos mesmos. Não obstante, tem-se uma deficiência quanto a métodos analíticos que permitam a determinação de multi-resíduos de antimicrobianos em peixes e conhecimento aprofundado sobre protocolos de validação.

Para facilitar a compreensão dos resultados e discussões desta tese, a mesma está apresentada em cinco capítulos. O **Capítulo I** apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto. O **Capítulo II** discorre os objetivos propostos. O

**Capítulo III** apresenta o desenvolvimento do método analítico para a determinação de multi-resíduos de quinolonas em carne de peixe, pelo emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à detecção por fluorescência e à espectrometria de massas. O **Capítulo IV** trata do ensaio desenvolvido com tilápias medicadas à base de oxitetraciclina (OTC), para o estudo do comportamento de depleção deste antimicrobiano na carne desses peixes. O **Capítulo V** apresenta as referências bibliográficas citadas nos demais capítulos da tese.

---

---

# **CAPÍTULO I**

*REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

---

---

## I.1. Introdução

A atual política de uma globalização mundial tem afetado fortemente o cenário da produção pecuária em todo o planeta. A necessidade de se manterem ou se tornarem competitivos na atividade, tem exigido que os países evoluam nas tecnologias de produção. Os artifícios lançados para se atingir tais objetivos têm despertado grande atenção da opinião pública frente aos afamados acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos, como foi o caso de benzeno na água e sucos de frutas, nitrofuranos em carne de frango, cloranfenicol no mel, entre outros (WHO, 2007), fazendo com que os países se empenhem na elaboração e aplicação de uma política de controle de qualidade dos alimentos destinados tanto ao consumo humano como animal.

Os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, podendo ser utilizados na produção animal para (i) tratar enfermidades (terapêutico), (ii) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de microrganismos patogênicos (profilático) e (iii) melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento) (ANADÓN & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999). O uso dessas substâncias em animais de produção pode levar à seleção de microrganismos resistentes ao agente ativo da substância utilizada.

De modo geral, verifica-se uma tendência mundial no sentido de redução do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento com vistas a eliminar o potencial risco da resistência de bactérias aos antimicrobianos (BELLAYER, 1999). No entanto, os antimicrobianos usados para fins terapêuticos devem continuar sendo utilizados na produção animal, visto que, epidemias podem rapidamente disseminar-se numa criação, provocando alta mortalidade e levando a elevados prejuízos econômicos.

No mundo todo, com algumas variações, estão entre os antimicrobianos licenciados para uso em peixes: oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, amoxicilina, florfenicol, entre outros, sendo os dois primeiros os mais utilizados

(WHO, 1998). Um ponto importante é o de que em alguns países existem regulamentações quanto ao uso desses medicamentos na piscicultura, porém, ainda não efetivamente aplicadas; já em outros países, nenhum regime de regulamentação existe.

## **I.2. A aqüicultura nacional**

A aqüicultura é um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo. Dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) para o período de 1984 a 1995, indicam que a produção mundial aumentou numa proporção de cerca de 10 % ao ano, passando de 10,4 milhões para 27,8 milhões de toneladas por ano. Em termos de recursos financeiros gerados, a produção aqüícola triplicou, passando de US\$ 13,1 bilhões em 1984, para US\$ 39,8 bilhões em 1994. Os autores também destacam que a aqüicultura está crescendo mais rapidamente nos países em desenvolvimento (Ásia, América do Sul, África e Oceania) quando comparados a países desenvolvidos (BORGHETTI & OSTRENSKY, 1998).

O Brasil é o País que apresenta o maior potencial do mundo para a produção de pescado através da aqüicultura, tendo em vista a vastidão de seu território, com mais de 2/3 ocupando a região tropical, bacias hidrográficas privilegiadas e ricas, onde se destaca a bacia amazônica responsável por 20 % da água doce do mundo. Merecem ainda destacar os cinco milhões de hectares de águas represadas em açudes (no Nordeste) e reservatórios construídos para a geração de energia hidroelétrica ou para abastecimento urbano e, também, a imensidade de seus mais de oito mil quilômetros de costa que possibilita uma enorme e variada atividade de aqüicultura de espécies marinhas (ANUALPEC, 2002).

A situação privilegiada do país não o dispensa da necessidade de preservar esse recurso. Sua distribuição no território nacional não se revela uniforme, e há de se salientar que as áreas de maior consumo não lhe dedicam a

atenção e os cuidados devidos. Quase 70 % da água disponível se encontra na região Norte, 15 % na região Centro-Oeste e 12,3 % no Sul e Sudeste. No Nordeste estão 2,7 % (ANUALPEC, 2005).

Mesmo com os 8.000 km de costa e condições climáticas bastante favoráveis, o País não apresenta destaque na produção de peixes marinhos. Este ramo de atividade é pouco desenvolvido em função das características da costa brasileira que é pouco protegida e não possui muitas áreas para alocação de gaiolas, bem como pela falta de alevinos/juvenis para suprir eventual demanda do mercado. Quanto à piscicultura de água doce, considerando o grande potencial climático e a disponibilidade de recursos hídricos adequados, pode-se afirmar que essa atividade ainda não deu seu grande salto no País (ANUALPEC, 2005).

O Brasil teve um aumento de 50 % na produção aquícola no período de 1995 a 1998. A produção nacional está concentrada na Região Sul, seguida, em ordem, pelas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte (BORGHETTI & OSTRENSKY, 1998).

A piscicultura aumentou sua contribuição na produção de pescado nacional em cerca de 20 % do ano 2000 para 2001. A tilápia é a espécie de peixe mais produzida no País, com destaque para a linhagem tailandesa, de melhor desempenho zootécnico e maior rendimento de carcaça. Nos últimos anos, a aquíicultura vem se expandindo no Estado de São Paulo, e ganhando importância relativa como produtora de proteína animal, já que a produtividade da piscicultura intensiva é elevada. Na aquíicultura interior, sobressai a piscicultura com criação principalmente de tilápias e diversas espécies de carpas (comum, cabeça grande, capim, prateada), os peixes redondos (pacú, tambaquis e seus híbridos), principalmente nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste, onde começam a se implantar projetos de médio e grande porte estimulados pelos "pesque-pagues" existentes (ANUALPEC, 2002).

### I.3. Antimicrobianos na aquicultura

Doenças infecciosas são consideradas como grande preocupação para a piscicultura por representarem potenciais riscos na produção e em perdas no estoque. Dentre as principais estratégias para o controle deste problema está o uso de substâncias antimicrobianas como medida terapêutica e/ou preventiva dentro de um sistema de produção.

O uso de antimicrobianos no tratamento profilático é particularmente comum durante períodos em que os animais estão mais sujeitos a condições de estresse, como por exemplo, mudanças na dieta, transporte, entre outros. Mesmo com a crescente ênfase na prevenção de doenças através de melhorias no manejo e nas condições ambientais, o sistema intensivo de produção animal ainda depende do uso de antimicrobianos.

Uma grande variedade de substâncias antimicrobianas é usada na produção animal em todo o mundo. Seu uso leva, inevitavelmente, à seleção de formas resistentes de bactérias em relação ao agente ativo da substância utilizada, tema esse de grande importância quanto ao potencial risco à saúde humana (WHO, 2004). Nos últimos anos, verifica-se uma preocupação crescente quanto ao uso dessas substâncias em dietas animais.

Atualmente, o desenvolvimento e a difusão da resistência aos antimicrobianos têm se tornado um problema de saúde pública global que tem impacto tanto no uso dessas substâncias em humanos como em animais.

A resistência antimicrobiana derivada do uso de antimicrobianos na aquicultura apresenta um risco a saúde pública de maneira direta e/ou indireta (FAO/OIE/WHO, 2006):

- Desenvolvimento da resistência bacteriana em ambientes aquáticos que podem infectar humanos - disseminação direta da resistência de ambientes aquáticos para humanos;
- Desenvolvimento da resistência adquirida em bactérias em ambientes aquáticos que pode agir como um reservatório de genes resistentes, e que podem ser transferidos até se incorporarem a patógenos

humanos - disseminação indireta da resistência de ambientes aquáticos para humanos causados pela transferência horizontal de gene.

A disseminação direta pode se dar (1) pelo consumo de produtos alimentícios de origem aquícola ou da água e (2) pelo contato direto com a água ou organismos aquáticos, ou através da manipulação dos produtos alimentícios aquícolas. As fluoroquinolonas são antimicrobianos importantes como tratamento de infecções potencialmente fatais (FAO/OIE/WHO, 2006).

Com relação à transferência horizontal de genes resistentes, já em 1955 foi reportada a resistência em *Aeromonas salmonicida* ao antimicrobiano sulfonamida, nos EUA e, na década de 60, linhagens multi-resistentes foram observadas no Japão. Mais tarde, *Aeromonas salmonicida* multi-resistente tem sido descrita em muitos países em várias partes do mundo, e plasmídeos com resistência transferível são comumente detectados nessas linhagens (SØRUM, 2006).

Determinantes de resistência transferível típica são aqueles que têm conferido resistência a sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprima, e estreptomicina. O uso de quinolonas no controle de infecções bacterianas desde 1980 resultaram no desenvolvimento de resistência à quinolona em linhagens de *Aeromonas salmonicida*. Esta resistência em *Aeromonas* foi principalmente mediada por mutação no gene girase A, e não se mostrou transferível (SØRUM, 2006). O desenvolvimento de resistência em patógenos de camarões tal como *Vibrio harveyi* devido à exposição a antimicrobianos tem sido reportado (KARUNASAGAR *et al*, 1994).

Algumas bactérias de ambientes aquáticos são filogeneticamente relacionadas a patógenos humanos. Isto aumenta a probabilidade da difusão de genes resistentes entre ambos ambientes (FAO/OIE/WHO, 2006).

No mundo todo, com algumas variações, estão entre os antimicrobianos licenciados para uso em peixes: oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, amoxicilina, florfenicol, entre outros, sendo os dois primeiros os mais utilizados (WHO, 1998).

#### I.4. Segurança alimentar

O uso de medicamentos veterinários é um recurso útil, muitas vezes necessário no setor produtivo, e que quando recorrido, o risco de resíduos dessas substâncias no alimento de origem animal deve ser levado em consideração.

Na Comunidade Européia, a questão de resíduos de antimicrobianos em alimentos é assunto endereçado à Reunião do Comitê de Peritos da FAO/WHO sobre Aditivos em Alimentos (JECFA). O Comitê para Produtos Medicinais de Uso Veterinário (CVMP) da Agência de Avaliação Medicinal Européia (EMA) é responsável pelo estabelecimento dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (Regulação do Conselho 90/2377/EEC) (ANADÓN, 1990) e da Ingestão Diária Aceitável (IDA) (ANADÓN & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

Para medicamento de uso veterinário, o LMR é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento, resultante do seu uso. É baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana considerando-se a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde. Ela é expressa em  $\text{mg kg}^{-1}$  de peso corpóreo. A determinação da IDA é baseada nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na época da avaliação (JECFA, 2007).

Quando se estabelece um LMR, são levados em consideração os resíduos que ocorrem nos alimentos, assim como os provenientes do ambiente. No entanto, o LMR pode ser fundamentado em boas práticas no uso de medicamentos veterinários e nas metodologias analíticas disponíveis.

No caso de substâncias proibidas, para as quais não há um LMR estabelecido, a Comunidade Européia (Diretiva 2002/657/EC) propõe o estabelecimento de um limite mínimo de performance requerida (LMPR), que representa a mínima quantidade da(s) substância(s) na amostra que pode ser detectada e confirmada (EC, 2002).

A Tabela I.1 relaciona alguns antimicrobianos representantes dos grupos das (fluoro)quinolonas e tetraciclinas – grupos de interesse no presente trabalho – de uso na piscicultura, bem como os respectivos LMR estabelecidos e divulgados pela EMEA/CVMP (EMEA, 2007).

**Tabela I.1** - Relação dos LMR de alguns antimicrobianos de uso na piscicultura (EMEA, 2007).

ANTIMICROBIANO	MATRIZ	LMR
<b>Grupo das (Fluoro)Quinolonas</b>		
Ácido Oxolínico		100 ng g <sup>-1</sup>
Enrofloxacina	Carne de peixe e pele em proporções naturais	100 ng g <sup>-1</sup>
Danofloxacina		100 ng g <sup>-1</sup>
Sarafloxacina		30 ng g <sup>-1</sup>
Flumequina		600 ng g <sup>-1</sup>
<b>Grupo das Tetraciclinas</b>		
Oxitetraciclina		100 ng g <sup>-1</sup>
Tetraciclina	Carne de peixe	100 ng g <sup>-1</sup>
Clortetraciclina		100 ng g <sup>-1</sup>

O *Codex Alimentarius* é um Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Trata-se de um fórum internacional de normalização sobre alimentos, criado em 1963, com sede em Roma, e suas normas têm como finalidade proteger a saúde da população, assegurando práticas eqüitativas no comércio regional e internacional de alimentos, fomentando e coordenando todos os trabalhos que se realizam em normalização. Na década de 70, o Brasil tornou-se membro deste Programa e, em 1980, com a criação do Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), através das Resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

(CONMETRO), conseguiu uma articulação mais representativa do setor alimentício. O CCAB tem como principais finalidades a participação nos Comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas Codex como referência para a elaboração, atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos (INMETRO, 2007).

### **I.5. Legislação nacional e inspeção**

No Brasil, em 1995, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, instituído pela Portaria Ministerial nº 527, de 15/08/1995 (Publicado no Diário Oficial da União de 16/08/1995, Seção 2, Página 6048). Este plano previa a adoção de programas setoriais de controle de remanescentes residuais em carne, leite, mel e pescado, em decorrência do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários, ou por acidentes envolvendo contaminantes ambientais. No entanto, até o início de 2006, dos programas setoriais elaborados, somente o de controle em carne estava implementado. A Portaria Ministerial nº 50, de 20/02/2006 (publicada no Diário Oficial da União em 03/03/2006, Seção 1, Página 15), estendeu a implementação do PNCR também para as outras fontes de carne (bovina, aves, suína e eqüina), leite, mel, ovos e pescado para o exercício de 2006. No entanto, até a atualização das atividades do PNCR descritas pela Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007 (publicada no Diário Oficial da União em 04/04/2007, Seção 1, Página 7), o programa ainda não inclui a determinação de quinolonas e tetraciclina em pescado – substâncias alvo do presente trabalho. As substâncias alvo do programa até o momento são: nitrofurazona, furazolidona, furaltadona, nitrofurantoina e cloranfenicol.

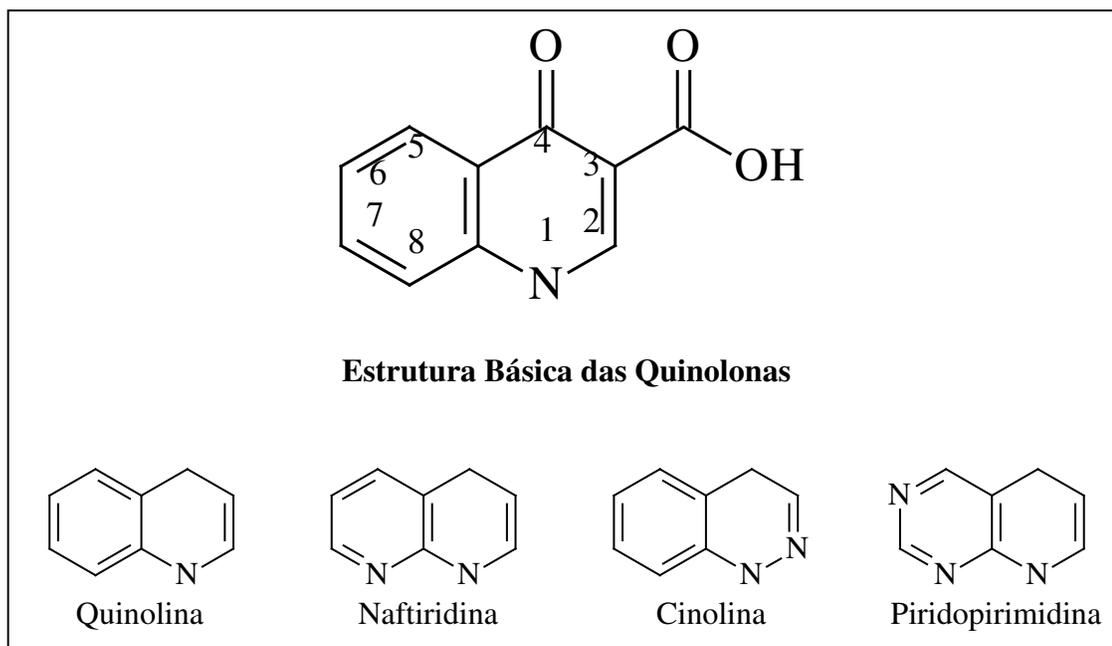
Também atento à importância da questão da presença de resíduos de contaminantes em alimentos para a saúde pública, o Ministério da Saúde (MS), representado pela Agência de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) criou em 2003, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de

Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet – (Resolução RDC nº 253 de 16/09/2003, publicada no Diário Oficial da União de 18/09/2003). Este programa prevê o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumo, porém apenas análises em amostras de leite está em fase de implementação.

## I.6. Quinolonas e tetraciclinas

As quinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos, especialmente ativos contra bactérias Gram-negativas, largamente empregadas no tratamento de infecções na medicina humana e veterinária. Seu alvo primário é a enzima DNA-girase ou topoisomerase II, responsável por tornar a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Formam o grupo mais importante de agentes antibacterianos sintéticos desde a descoberta das sulfonamidas. O primeiro composto obtido, em 1962, foi o ácido nalidíxico (1-etil-1,4-diidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-ácido carboxílico) (LESHER *et al*, 1962).

As quinolonas contêm em suas estruturas moleculares nitrogênio, compostos aromáticos heterocíclicos com um grupo cetona na posição 4 e um grupo carboxílico na posição 3. O núcleo principal usualmente contém um átomo de nitrogênio (quinolinas), mas análogos têm nitrogênios adicionais na posição 2 (cinolinas), posição 8 (naftiridinas) ou posição 6 e 8 (piridopirimidinas). A estrutura básica das quinolonas é apresentada na Figura I.1 (HERNÁNDEZ-ARTESERVOS *et al.*, 2002<sup>a</sup>).



**Figura I.1** - Estrutura molecular das quinolonas.

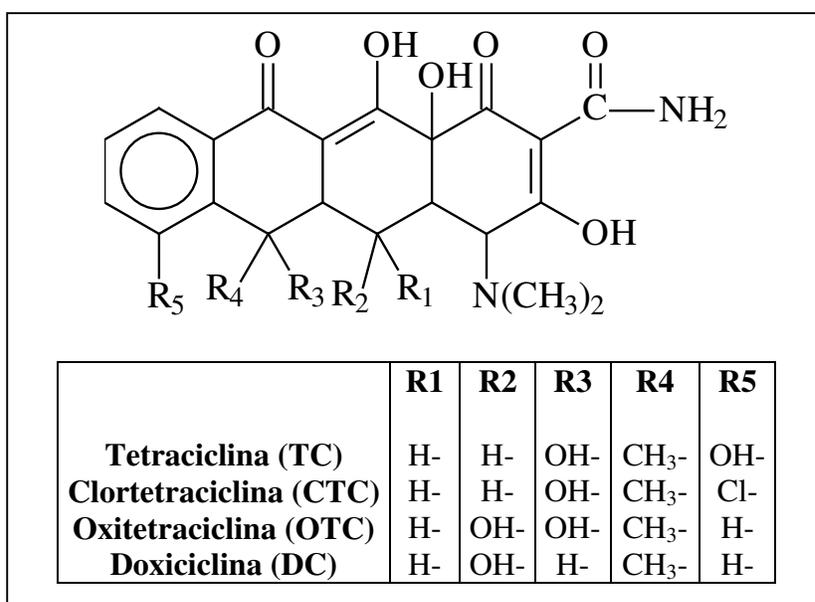
Desde a descoberta do ácido nalidíxico (um protótipo da quinolona antibacteriana) em 1962, várias modificações estruturais têm aumentado o espectro de ação das quinolonas. Estas modificações incluem a introdução dos grupos alquil ou aril na posição 1 e substituições fluoro e piperazinil nas posições 6 e 7, respectivamente. O grupo fluoro na posição 6, que origina as fluoroquinolonas, ampliam o espectro de atividade contra ambos os patógenos gram-negativo e gram-positivo. A introdução de um grupo piperazinil na posição 7 melhora a atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (BALL, 2000).

Desde meados da década de 80, as fluoroquinolonas têm se tornado o principal grupo de antimicrobianos sintéticos com espectro de atividade que inclui desde *Enterobacteriaceae* e oportunistas tais como *Pseudomonas aeruginosa*, até patógenos gram-positivos, incluindo *streptococci* e *staphylococci*. Essas mudanças resultaram em representantes como a ciprofloxacina e a ofloxacina, que são indicadas para uma grande variedade de patógenos, e se tornaram

alternativas em condições comprometidas pelo surgimento de microrganismos resistentes a agentes padrões, tais como os  $\beta$ -lactâmicos (BALL, 2000).

As tetraciclinas representam um grupo de antimicrobianos que apresentam um espectro de ação bastante amplo, sendo eficiente contra um grande número de microrganismos causadores de diversas enfermidades, e por isso, têm destacado emprego pela medicina veterinária no tratamento de doenças.

As estruturas moleculares de algumas tetraciclinas estão apresentadas na Figura I.2.



**Figura I.2** - Estrutura molecular das tetraciclinas.

Desde a descoberta do primeiro membro deste grupo, em 1948, a clortetraciclina e outros representantes estão comercialmente disponíveis, dentre os quais a oxitetraciclina, são comumente empregadas na medicina veterinária em todo o mundo por apresentar vantagens quanto à eficácia, e quanto à economia, em comparação com outros antimicrobianos (OKA & MATSUMOTO, 2000). Em peixes, a oxitetraciclina é utilizada no combate a furunculoses, úlceras e outras infecções causadas por bactérias gram-negativas (UENO *et al*, 1999).

Resíduos de tetraciclina em alimentos podem causar reações alérgicas, desequilíbrio da flora intestinal, favorecimento de patógenos e desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, além de problemas tecnológicos relacionados ao processamento de alimentos.

Os termos tetraciclina e cloridrato de tetraciclina têm sido usados como sinônimos (FLOREY, 1984). O cloridrato de clortetraciclina (CTC) é um sal de uma substância antibiótica isolada de *Streptomyces aureofaciens* e foi introduzida na clínica médica em 1948 (FLOREY, 1984). A oxitetraciclina derivada da *Streptomyces rimosus*, foi introduzida em 1950. A tetraciclina obtida por dehalogenação catalítica da clortetraciclina, tornou-se disponível comercialmente em 1953 (KATZUNG, 1995).

### **I.7. Métodos analíticos para a determinação de antimicrobianos em carne de peixe**

Para a inspeção de resíduos de antimicrobianos em alimentos é essencial que métodos analíticos validados estejam disponíveis.

O controle de qualidade dos alimentos de origem animal quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários é imprescindível na questão da segurança alimentar. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade adequadas para quantificar eventuais resíduos dessas substâncias que possam estar presentes em tecidos de animais destinados à produção de alimentos. Na determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos, como a carne de peixe, deve ser dada uma atenção especial ao preparo da amostra que antecede a análise instrumental.

Devido ao fato de os alimentos serem matrizes complexas, possuindo compostos desde simples sais inorgânicos até grandes moléculas protéicas, uma etapa de preparo de amostras se faz necessária antes do procedimento analítico de determinação dos mesmos.

O preparo da amostra envolve geralmente etapas de extração do antimicrobiano da matriz por procedimentos de extração sólido-líquido, limpeza do

extrato (*clean-up*) e concentração do(s) analito(s) utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE).

Cada uma das etapas a serem empregadas no preparo de amostra deve levar em consideração as propriedades físico-químicas dos analitos em questão, para a melhor seleção possível dos reagentes envolvidos em cada um dos processos a serem empregados.

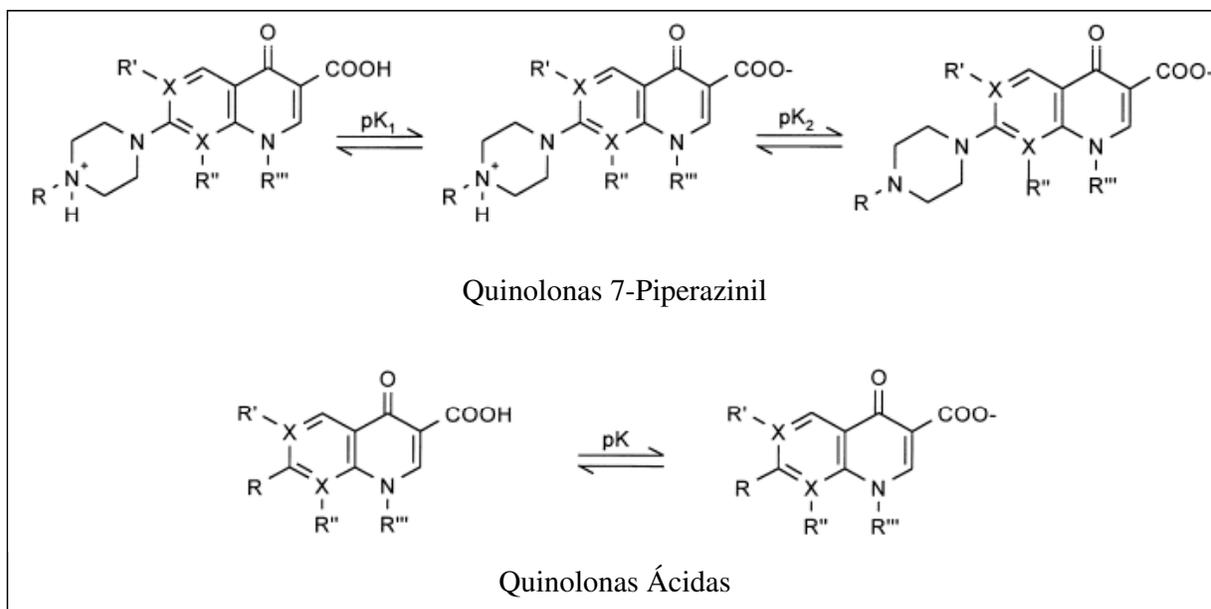
Os métodos analíticos que visam a determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos requerem considerações técnicas especiais. Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) devem ser levados em consideração no estabelecimento e validação do método, de modo a garantir que o método desenvolvido seja capaz de quantificar o resíduo destas substâncias com exatidão e precisão adequadas.

### ***1.7.1. Quinolonas***

Um conhecimento das características físico-químicas das quinolonas é muito importante para o desenvolvimento de métodos analíticos que visam a determinação deste grupo de antimicrobianos em alimentos de origem animal.

Em termos analíticos, as estruturas moleculares das quinolonas apresentam algumas características muito importantes. O grupo carboxílico na posição 3 as caracteriza como compostos ácidos. Por outro lado, as 7-piperazinilquinolonas incluem grupos amina adicionais, que são básicos. No entanto, em solução aquosa, as 7-piperazinilquinolonas apresentam três diferentes espécies, que são catiônicas, zwitteriônicas e aniônicas, enquanto as outras quinolonas podem somente ser neutras ou aniônicas. Os equilíbrios existentes para estes dois tipos de quinolonas é mostrado na Figura 1.3. As quinolonas com apenas um valor de  $pK_a$  na região de pH fisiológico são referidas como quinolonas ácidas (QA) e aquelas com dois valores de  $pK_a$  (devido à presença de um anel piperazinil) são chamadas de quinolonas piperazinil (QP). Os valores reportados de  $pK_a$  para QA variam de 6,0 a 6,9, enquanto para as QP, os

valores estão entre 5,5-6,6 e 7,2-8,9 para  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$ , respectivamente (HERNÁNDEZ-ARTESEROS *et al*, 2002<sup>a</sup>).



**Figura I.3** - Equilíbrio ácido-base para as quinolonas.

As quinolonas são solúveis em solventes polares, e insolúveis em solventes apolares tais como hexano ou tolueno. São solúveis em meios básicos e ácidos aquosos ou aquoso-orgânicos. Assim, a extração de quinolonas de matrizes biológicas como a carne de peixe, pode ocorrer de diferentes formas: (i) extração com solventes orgânicos de média a alta polaridade tais como acetato etílico, acetona, ACN, etanol ou MeOH; (ii) partição entre uma amostra homogeneizada em solução tampão aquosa e um solvente orgânico não miscível como acetato etílico, clorofórmio ou diclorometano; (iii) extração com misturas aquoso-orgânicas ácidas ou básicas, ou mesmo soluções aquosas tamponadas (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

A maioria dos procedimentos de preparo de amostra para extração de quinolonas em alimentos, descrita na literatura, consiste de extração sólido-líquido (LSE) e/ou extração em fase sólida (SPE), conforme serão apontados alguns exemplos mais adiante.

Etapas de limpeza do extrato por SPE são principalmente aplicadas após a extração das quinolonas da matriz com solventes polares. Em alguns casos, a remoção de gordura com hexano é realizada antes da SPE. Cartuchos de fase reversa, principalmente C<sub>18</sub> e em alguns casos C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub> ou poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB), são comumente usados para quinolonas ácidas (QA) e quinolonas 7-piperazinil (QP). Levando em consideração que estes sorventes apolares retém preferencialmente quinolonas sem cargas quando dissolvidas em um solvente polar, a amostra é adicionada ao cartucho em soluções aquosas ou aquoso-orgânicas com pH neutro ou ácido. Misturas aquoso-orgânicas com MeOH e soluções ácidas ou básicas (contendo mais de 75 % de MeOH) são os eluentes mais usados. Alternativamente, cartuchos de troca catiônica são usados na determinação de QP, as quais podem se apresentar como espécies catiônicas. Há ainda outras alternativas possíveis para SPE, como colunas de troca aniônica (QP e QA) e colunas de imunoafinidade (HERNÁNDEZ-ARTESEROS *et al*, 2002<sup>a</sup>).

O maior destaque dos métodos analíticos empregados para a determinação das quinolonas em amostra de carne de peixe é dado ao emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As colunas analíticas mais usadas em técnicas cromatográficas de HPLC reconhecidamente são as de fase reversa à base de sílica, principalmente C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>. Devido aos grupos silanóis residuais e impurezas metálicas dos materiais de recheio dessas colunas, as mesmas podem levar a problemas de assimetrias dos picos cromatográficos (efeito cauda). Aliado a esse fato tem-se que as fluoroquinolonas possuem caráter anfótero, o que prejudica a separação destes compostos nesse tipo de coluna, e os picos cromatográficos não apresentam simetrias adequadas, afetando a resolução e a eficiência. Para tanto, métodos mais recentes de separação de quinolonas por HPLC têm feito uso de colunas capeadas (*endcapped*) ou de sílica de alta pureza, tais como Inertsil, Kromasil, Puresil, Versapack, Wakosil, L-column, LUNA ou Zorbax RX, que são livres de traços metálicos responsáveis pelas propriedades ácidas dos grupos silanóis (STOLKER & BRINKMAN, 2005; HERNÁNDEZ-ARTESEROS *et al*, 2002<sup>a</sup>).

As colunas analíticas poliméricas (YORKE & FROC, 2000; ROUDAUT & YORKE, 2002) são alternativas para se obter picos com melhor simetria. No entanto, essas colunas são menos resistentes quando comparadas com as colunas à base de sílica (KIM & LEE, 1996).

A grande maioria dos métodos de HPLC, empregando fase estacionária reversa para determinação de quinolonas, faz uso de misturas para compor a fase móvel contendo ACN ou MeOH, ou uma mistura de ambos os solventes como modificador orgânico, com soluções aquosas. Ainda com o objetivo de melhorar a simetria dos picos cromatográficos, agentes redutores de cauda do pico são adicionados. O pH normalmente é mantido entre 2 e 4, para que haja uma redução da ionização de silanóis e minimizar suas interações com as quinolonas, que no caso estão presentes como espécies catiônicas (QP). Embora soluções de tampão fosfato (YORKE & FROC, 2000; SU *et al*, 2003; RAMOS *et al*, 2003) sejam utilizadas para esse ajuste de pH, outras soluções, tais como tampão cítrico (BAILAC *et al*, 2004), ácido fosfórico (ROUDAUT & YORKE, 2002) ou ácido oxálico (MERÁS *et al*, 1998; SAMUELSEN *et al*, 2000; HERNÁNDEZ-ARTESEROS *et al*, 2002<sup>b</sup>) são também usadas.

Várias técnicas espectroscópicas tais como absorção na região do UV, fluorescência (FL) ou espectrometria de massas (MS), podem ser usadas em associação à cromatografia líquida para a detecção de quinolonas. A absorção UV foi a técnica de detecção mais empregada nos primeiros trabalhos que envolveram a determinação de quinolonas, enquanto que a fluorescência vem se destacando atualmente por apresentar maior seletividade e melhor detectabilidade em relação ao primeiro. A espectrometria de massas apresenta alta seletividade e sensibilidade, normalmente usada em análises confirmatórias de identidade. No entanto, a difusão do seu emprego ainda é limitada pelo alto custo dos equipamentos.

A Tabela I.2 discrimina as principais etapas dos procedimentos de preparo de amostra de carne de peixe para extração de (fluoro)quinolonas e dos métodos analíticos com HPLC de alguns trabalhos publicados na literatura.

**Tabela I.2** - Procedimentos para determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC.

Analitos	LSE	LLE ou SPE	Rec. (%)	FE	FM	Det.	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Ref.
AOX	Acetato Etilico	-	70-78	C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ATFA (0,1 %), MeOH e ACN	FL	2	5	TYRPENOU & RIGOS (2004)
FLM, AOX, SAR	Tampão pH 9 e ACN	Hexano (LLE)	57-71	RP polimérica (150 x 4,6 mm, 5 µm)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,2 e ACN	FL	2-7	15-75	ROUDAUT & YORKE, 2002
AOX, FLM, ENR, DAN, SAR	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> e ACN	C <sub>18</sub> (SPE)	74-85	C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,5) e ACN	DAD e FL	10-40 (DAD) e 0,6-50 (FL)	-	SU <i>et al</i> (2003)
AOX, FLM, ENR	Ácido acético (0,1 %) e ACN	NH <sub>2</sub> (SPE)	40-80	C <sub>18</sub> (250 x 3 mm, 5 µm)	Ácido Fórmico e ACN	MS (ToF)	1-3	3-9	HERNANDO <i>et al</i> (2006)
AOX, FLM, ENR, CIP, DAN, SAR	ACN	RP polimérico e de troca aniônica (SPE)	35-80	C <sub>18</sub> (150 x 2,1 mm, 5 µm)	Ácido Fórmico e ACN	MS/MS (QQQ)	1-3 ng g <sup>-1</sup>	5-10	JOHNSTON <i>et al</i> (2002)

**Onde:** LSE: extração sólido-líquido; LLE: extração líquido-líquido; SPE: extração em fase sólida; Rec.: recuperação; FE: fase estacionária; FM: fase móvel; Det.: detecção; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; Ref.: referência bibliográfica; AOX: ácido oxolínico; FLM: flumequina; ENR: enrofloxacina; DAN: danofloxacina; SAR: sarafloxacina; RP: fase reversa; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; ATFA: ácido trifluoroacético; FL: fluorescência; DAD: arranjo de diodos; MS: espectrometria de massas.

### ***1.7.2. Tetraciclinas***

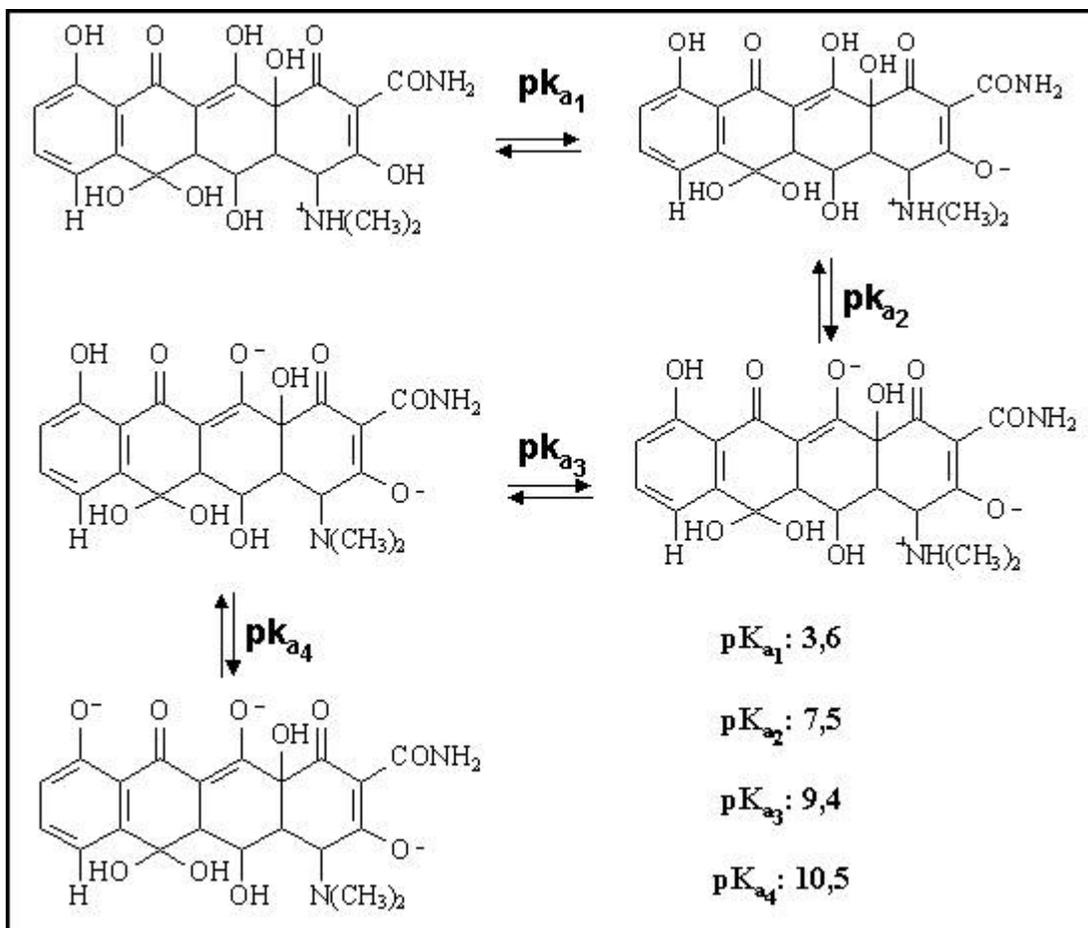
ANDERSON *et al* (2005) publicaram um trabalho de revisão abrangendo toda a complexidade envolvida na quantificação de tetraciclinas por cromatografia líquida, detalhando a química deste grupo de antimicrobianos, e etapas do método analítico como extração em matrizes diversas e limpeza do extrato.

Como etapas preliminares de extração, a maioria dos procedimentos descritos na literatura envolvendo alimentos como matriz faz uso de uma homogeneização da matriz com soluções aquosas, principalmente envolvendo o emprego do tampão McIlvaine (pH 4,0) contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA). KULSHRESTHA *et al* (2004) reportaram alta solubilidade em pH 4 onde as tetraciclinas estão em equilíbrio, prevalecendo a forma zwitteriônica. Soluções de ácido succínico (pH 4) também têm sido empregadas para extração em amostras de alimentos (CARSON *et al*, 1998; CHERLET *et al*, 2003).

Os equilíbrios existentes para as tetraciclinas são mostrado na Figura I.4, tomando a molécula da oxitetraciclina como exemplo.

Em etapas de limpeza do extrato (*clean up*) por SPE, devido ao esqueleto carbônico, região aromática, e grupos funcionais variados, as tetraciclinas (Figura I.2, p.15) podem teoricamente ser separadas da matriz alimento por vários tipos diferentes de cartuchos SPE. A região apolar do sistema de anéis permite usar sorventes de fase reversa C<sub>18</sub> ou polimérica, enquanto cartuchos fenil exploram a vantagem da região aromática do anel D. Para cartuchos de fases reversas, vários autores têm indicado o cartucho de fase polimérica como sendo melhor que os C<sub>18</sub> à base de sílica (PENA *et al*, 2003; CINQUINA *et al*, 2003; e CHERLET *et al*, 2003). Nos cartuchos poliméricos, a recuperação ótima é obtida quando as tetraciclinas são adicionadas em meio ácido, onde o pH é próximo ou abaixo do valor do pK<sub>a1</sub> (CHENG *et al*, 1997; e ZHU *et al*, 2001). Devido à afinidade das tetraciclinas em adsorver a grupos silanóis presentes em fases octadecil à base de sílica e formarem complexos com os resíduos metálicos, um pré-tratamento de SPE C<sub>18</sub> com EDTA (OKA *et al*, 1994), com as tetraciclinas sendo adicionadas em meio tamponado contendo EDTA (BRILLANTES *et al*, 2001) tem melhorado os

resultados. Entre outras fases de SPE que já foram usadas para tetraciclina estão a fenil (MEINERTZ *et al*, 1998) e cicloexil (BLANCHFLOWER *et al*, 1989).



**Figura I.4** - Equilíbrio ácido-base para a oxitetraciclina (adaptado de MAMANI, 2007).

A interação das tetraciclina com silanóis e traços metálicos presentes em colunas analíticas de fase reversa à base de sílica contribui significativamente para a assimetria dos picos cromatográficos. Devido a isto, colunas de fases reversas capeadas (*end-capped*) têm sido preferidas para o emprego na separação de tetraciclina devido à habilidade oferecida de minimizar as interações com os silanóis residuais. Fases poliméricas também têm sido preferidas por eliminar a interação com silanóis e com traços metálicos. Colunas fenil também são usadas pela seletividade ao sistema aromático (interação  $\pi$ - $\pi$ )

das tetraciclinas, o que permite um aumento no tempo de retenção e no poder de separação dessas moléculas e de suas impurezas isoméricas ou interferentes da matriz (RUPP & ANDERSON, 2005).

A maioria dos trabalhos publicados cita o emprego de fases móveis compostas por tampão aquoso, ACN e/ou MeOH, conforme serão apresentados exemplos mais adiante.

Como sistema de detecção, diversos trabalhos empregam UV, FL ou mesmo MS. As tetraciclinas apresentam forte absorbância em comprimentos de onda de 270-360 nm quando em soluções neutras à ácidas (MITSCHER, 1978). A maioria dos trabalhos que reportam a determinação de tetraciclinas por absorbância no UV ocorre principalmente em meio ácido, onde são normalmente monitoradas em comprimentos de onda de 350-365 nm. Para tanto, são empregados, entre outros, tampão acetato (IWAKI *et al*, 1992), ácido oxálico (VINAS *et al*, 2004), ácido cítrico (WALSH *et al*, 1992), ácido acético (FURUSAWA, 1999), ácido trifluoroacético (CHENG *et al*, 1997).

Para serem determinadas por fluorescência, as tetraciclinas são tipicamente solubilizadas em soluções neutras a levemente alcalinas, na presença de cátions metálicos tais como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ou  $Al^{3+}$ , que contribuem para o aumento da intensidade de fluorescência das tetraciclinas. A detecção é acompanhada no comprimento de onda  $\lambda_{exc}$  de 380-390 nm, e  $\lambda_{em}$  de 490-520 nm. A intensidade de fluorescência é constante em pH 6,5-7,5 (IWAKI *et al*, 1992).

A espectrometria de massas (MS) também tem sido empregada para a detecção de tetraciclinas pela habilidade de alta seletividade e sensibilidade, compondo métodos de confirmação de identidade das tetraciclinas mesmo em níveis de resíduo ( $ng\ g^{-1}$ ).

A Tabela I.3 discrimina as principais etapas de procedimento de preparo de amostra de carne de peixe para extração de tetraciclinas, e dos métodos analíticos empregando HPLC, de alguns trabalhos publicado na literatura.

**Tabela I.3** - Procedimentos para determinação de tetraciclinas em carne de peixe por HPLC.

Analitos	LSE	SPE	Rec. (%)	FE	FM	Det.	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Ref.
OTC, TC, CTC, DC	Mcllvaine -EDTA pH 4	C <sub>18</sub> (SPE)	57-78	C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm)	Ác. Oxálico, MeOH e ACN	UV	-	12-65	CASTELARI & GARCÍA- REGUEIRO (2003)
OTC, TC, CTC, DC	Mcllvaine -EDTA pH 4	SPME	-	C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm)	Ác. Oxálico, MeOH e ACN	DAD	26-30	-	WEN <i>et al</i> (2006)
OTC, TC, CTC	Tampão Citrato, MnCl <sub>2</sub> e ACN	-	58-84	Fenil (150 x 3 mm, 3,5 µm)	TP pH 6,5 e MeOH	FL	-	0,15-1,5	SCHNEIDER <i>et al</i> (2007)
OTC	Mcllvaine -EDTA pH 4	C <sub>18</sub> (SPE)	78-83	C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 5 µm)	Diamonihidro- fosfato, dietanolamina, dimetilformamida e ACN	DAD	50	-	NAMDARI <i>et al</i> (1996)

**Onde:** LSE: extração sólido-líquido; SPE: extração em fase sólida; SPME: microextração em fase sólida; Rec.: recuperação; FE: fase estacionária; FM: fase móvel; Det.: detecção; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; Ref.: referência bibliográfica; OTC: oxitetraciclina; TC: tetraciclina; CTC: clortetraciclina; DC: doxicilina; RP: fase reversa; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; ATFA: ácido trifluoracético; FL: fluorescência; DAD: arranjo de diodos; MS: espectrometria de massas.

## I.8. Validação analítica

Os laboratórios que realizam as análises em alimentos precisam ter capacidade técnica comprovada para tal compromisso, a qual é garantida pelas normas de credenciamento estabelecidas por órgãos responsáveis, que no Brasil são representados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007), que disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos (Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 03/2003, respectivamente). Há ainda órgãos internacionais como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 2007), Organização Internacional para Padronização (ISO, 1999), Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2007), Comunidade Européia (EC, 2002), Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO, 1997), a agência norte-americana de Administração de Drogas e Alimentos (FDA, 1996), que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios.

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis.

Uma questão de suma importância no delineamento das etapas a comporem o procedimento de validação de um método analítico está justamente no estabelecimento dessas etapas. A validação de um método desenvolvido, ou mesmo, a validação de modificações de ajuste de métodos já publicados, mesmo os oficiais, envolve uma etapa crítica que é o julgamento do nível de validação necessário conforme o objetivo a que se destina o método analítico.

A IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002) destaca que, no que diz respeito à análise de alimentos, os requerimentos para os métodos analíticos envolvem um exame das características do método em estudos de desempenho a partir de ensaios inter-laboratoriais (que envolve diferentes laboratórios, também conhecido como ensaio de proficiência, estudo colaborativo ou triagem colaborativa). Um

número mínimo de laboratórios é requerido para participar dos estudos inter-laboratoriais, preenchendo os requisitos para comporem o que a IUPAC classifica como procedimento de validação completa do método analítico (*full validation*). No entanto, nem sempre é prático ou necessário promover a validação completa de um método analítico. Em tais circunstâncias a IUPAC considera apropriado o que chama de validação do método em um único laboratório (*single-laboratory validation*). Essas circunstâncias podem ocorrer quando se pretende garantir a viabilidade do método antes de se proceder a validação completa, e/ou como etapa preliminar de avaliação de um método desenvolvido e na publicação de artigos científicos (THOMPSON *et al*, 2002).

Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) mais usados para avaliar métodos de separação são: especificidade/seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. A seguir são apresentadas as definições, em especial da IUPAC, e os procedimentos recomendados pela EC, FDA e ANVISA para cada um dos parâmetros de validação delineados para metodologias desenvolvidas em um laboratório (*single-laboratory validation*), visando a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes biológicas.

### **1.8.1. Seletividade**

A seletividade é a capacidade de um método em quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes presentes na amostra. É um parâmetro que deve ser demonstrado e que depende do método analítico empregado. Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (THOMPSON *et al*, 2002).

As recomendações da EC (2002) para avaliar a seletividade de um método analítico são delineadas a seguir:

- Selecionar compostos quimicamente relacionados ao analito (metabólitos, derivados, etc.) ou outras substâncias prováveis de estarem presentes com o(s) composto(s) de interesse nas amostras;
- Analisar um número apropriado ( $n \geq 20$ ) de amostras isentas do(s) composto(s) de interesse (amostra branco) e verificar por qualquer interferência (sinal, picos, íons traços) na região esperada de eluição do analito de interesse.
- Fortificar, a um nível relevante, amostras isentas do(s) composto(s) de interesse com substâncias que possam vir a interferir na identificação e quantificação do analito.

Após as análises, deve-se verificar se: (i) a presença de interferentes pode levar a uma identificação falsa; (ii) a identificação do analito alvo é prejudicada pela presença de um ou mais interferentes; ou (iii) a quantificação é notadamente influenciada pela presença de um ou mais interferentes (EC, 202).

A ANVISA (2003) segue as recomendações da FDA (2001) e acrescenta que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20 % da resposta do limite de quantificação (LOQ, item I.8.5, p.31).

No caso do emprego da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), a FDA (2001) recomenda que seja também avaliado o efeito matriz.

### ***1.8.2. Efeito matriz***

Quando a espectrometria de massas for empregada como sistema de detecção em associação com a cromatografia líquida, algumas considerações devem ser feitas em relação ao efeito matriz, uma vez que a matriz pode causar uma supressão da eficiência de ionização e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução na sensibilidade do método (ROGATSKI & STEIN, 2005). A FDA (2001) recomenda que esse parâmetro deva ser avaliado para validação de métodos empregando a LC-MS ou LC-MS/MS para garantir que a precisão,

seletividade e sensibilidade não sejam afetadas. A ANVISA (2003) não faz menção sobre a avaliação do efeito matriz.

Segundo ROGATSKY & STEIN (2005) a extensão do efeito matriz na LC-MS/MS pode ser avaliada da seguinte forma:

- Adicionar o analito a uma amostra branco e comparar a razão sinal-ruído, área ou altura do pico obtido pelo método com o analito adicionado ao solvente puro.
- Quando não se tiver disponível uma matriz branco pode se realizar a comparação mediante adição de um padrão interno marcado isotopicamente à amostra e ao solvente puro.

Segundo a recomendação de ROGATSKY & STEIN (2005) não fica explícito se a adição do analito deve ser realizada antes do preparo de amostra ou no extrato final a ser injetado no LC-MS. Nesse sentido, é importante ressaltar que para avaliar o efeito matriz, deve ser comparado o sinal obtido para o(s) analito(s) que foi adicionado na matriz após esta já ter passado pelo procedimento de extração, com o sinal do analito no solvente (solução padrão). Se for comparado o sinal obtido da análise da amostra branco que tenha sido fortificada com o(s) analito(s) antes do preparo da mesma, com o sinal do analito no solvente, o que estará sendo avaliado de fato será o efeito matriz mais a eficiência de extração.

### ***1.8.3. Curva analítica, linearidade e sensibilidade***

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito no qual o método pode ser aplicado. Segundo a ANVISA (2003), a curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Uma vez que o termo calibração é mais pertinente para instrumentos de medição e padrões, sugerimos, e estaremos empregando o termo curva analítica para expressar a relação sinal (resposta) em função da concentração do analito, em vez de curva de calibração como empregado pela ANVISA (2003) e FDA (2001).

De acordo com as recomendações da FDA (2001), a curva analítica deve ser construída usando uma amostra branco, amostra zero (amostra branco adicionada do padrão interno), e mais matrizes fortificadas com o analito para seis a oito níveis de concentração, abrangendo a faixa de concentração esperada e incluindo o Limite de Quantificação, que será melhor apresentado no item 1.8.5 (p.31). Como critérios de avaliação, a FDA recomenda que os resultados devam ser analisados por métodos estatísticos (regressão linear pelo método dos mínimos quadrados) e que deva ser usado o modelo mais simples que adequadamente descreva a relação concentração-resposta.

A IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002) recomenda que os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados entre si, estar sobre a faixa de concentração de interesse, e abranger a faixa de 0 a 150 % do valor esperado, que, no caso da análise de resíduos de medicamentos veterinários, assunto alvo do presente trabalho, corresponde ao(s) Limite(s) Máximo(s) de Resíduo(s) (LMR) estabelecido(s) para a(s) substância(s) alvo(s).

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear. A ANVISA (2003) preconiza que o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98, e a Comunidade Européia 0,99 (EC 2002).

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detector varia em função da concentração do analito, e é comumente expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida da regressão linear da respectiva curva analítica.

#### **1.8.4. Limite de detecção (LOD)**

O limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do zero (THOMPSON *et al*, 2002) ou do ruído de fundo (ANVISA, 2003). De modo geral, o LOD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode

ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

Existem diferentes procedimentos para estimar o LOD, entre esses o método visual, razão sinal-ruído e a partir da curva analítica.

A IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002) recomenda que se estime o LOD a partir de pelo menos seis determinações independentes do analito na amostra branco ou em uma amostra contendo o analito em uma concentração baixa, no entanto, distinguível de zero ou resultado negativo, sendo o valor de LOD estabelecido pelo cálculo de três vezes a estimativa do desvio padrão das medidas.

A ANVISA (2003) sugere apenas que o LOD deve ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, recomendando que o LOD seja 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base, no entanto, não fazendo referência se o estudo deve ser realizado com a matriz e o número de replicatas que devem ser realizadas. O ICH recomenda a determinação de LOD pela razão sinal-ruído (3:1 para o sinal e ruído da linha de base) (ICH, 1996).

#### ***1.8.5. Limite de quantificação (LOQ)***

A definição segundo a IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002) para o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Assim como ocorre para o LOD, existem diversas formas de se estabelecer o LOQ (ICH, 1996).

A ANVISA (2003) segue as recomendações da FDA (2001) e cita que o LOQ pode ser obtido por meio da análise da amostra branco adicionada de concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Propõe, ainda, para o estabelecimento do LOQ o emprego da razão de 5:1 para o sinal e ruído da linha de base.

Segundo o INMETRO (2003) o LOQ pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média da amostra branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Algumas vezes é também denominado “limite de determinação”, no entanto, a terminologia limite de quantificação é mais usada.

Como na prática o LOQ deve corresponder ao primeiro nível de concentração da curva analítica, algumas agências reguladoras, ANVISA (2003) e FDA (2001), têm substituído o termo LOQ por limite inferior de quantificação (LIQ) ou *lower limit of quantification* (LLOQ), respectivamente. É importante ressaltar para que o método seja aceitável para a determinação de resíduo de medicamentos veterinários em alimentos, o LOQ deve ser menor do que o LMR ou LMPR (Limite Mínimo de Performance Requerida) estabelecido para o analito em questão.

#### **1.8.6. Precisão**

Segundo a IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002), a precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque proposto neste trabalho, duas etapas são relevantes para esse parâmetro: (i) precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante análises em um curto espaço de tempo; e (ii) precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes condições (geralmente em dias diferentes).

Assim como a IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002), a FDA (2001) e a ANVISA (2003) também subdividem o parâmetro precisão em intra- e inter-ensaios. Recomendam para a composição dos ensaios, a seleção de pelo menos três diferentes concentrações em torno da concentração de interesse; um mínimo de cinco determinações para cada concentração analisada (n= 5). Expressando a precisão em termos de coeficientes de variação (CV), a FDA (2001) e a ANVISA

(2003) recomendam que os resultados não excedam 15 % de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20 % do CV). Já a IUPAC estabelece que os resultados obtidos não devem exceder 30 % do valor central, (THOMPSON *et al*, 2002).

### **1.8.7. Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON *et al*, 2002). A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência ou *bias*) (INMETRO, 2003).

A exatidão pode ser obtida mediante: (i) uso de material de referência certificado (MRC), (ii) comparação de métodos ou (iii) ensaios de recuperação (MILLER & MILLER, 1993).

Para os métodos destinados à análise de alimentos quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários, a exatidão tem sido avaliada costumeiramente mediante o teste de recuperação, visto que existem poucos MRC disponíveis. O ensaio de recuperação, conforme definições das agências reguladoras IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002), FAO (1997) e EC (2002), é realizado mediante adição do analito em diferentes concentrações nas amostras branco. As análises são realizadas conforme procedimento estabelecido e as respectivas concentrações experimentais calculadas pela curva analítica.

### **1.8.8. Robustez**

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta face à pequenas variações (INMETRO, 2003). Um método diz-se robusto quando se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando o mesmo está sendo executado. As agências reguladoras

empregam diferentes termos para expressar a robustez do método: *ruggedness* (EC, 2002; THOMPSON *et al*, 2002) e *robustness* (ICH, 1996). Cabe ressaltar que embora esses dois termos tenham sido empregados, não existe uma diferença clara entre os mesmos, o que pode levar a uma confusão na interpretação das definições, assim como, não está estabelecido se o parâmetro robustez deve ser avaliado durante o desenvolvimento ou validação do método. O ICH (1996) recomenda a avaliação da robustez (*robustness*) no desenvolvimento do método e sugere como variáveis a serem avaliadas para um método de cromatografia líquida de alta eficiência: pH da fase móvel, composição da fase móvel, colunas de diferentes marcas ou lotes, temperatura e vazão.

Enquanto a FDA (2001) e a ANVISA (2003) não incluem a robustez na validação de métodos destinados à análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, a EC (2002) recomenda a avaliação deste parâmetro (*ruggedness*), empregando um planejamento fatorial (teste de Youden). Neste teste são realizadas oito combinações de sete fatores de variáveis. No entanto, a EC (2002) cita como exemplos de variáveis diferentes espécies, diferentes matrizes e condições de amostragem, que são consideradas fontes de maiores variações nos resultados e, embora sejam relevantes, não se enquadram na definição do termo robustez.

---

---

# **CAPÍTULO II**

## *OBJETIVOS*

---

---

O objetivo geral do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de resíduos de antimicrobianos da classe das quinolonas e tetraciclinas em peixe e realização de um ensaio com tilápias para avaliar comportamento de depleção de resíduos na carne.

Os objetivos específicos compreenderam:

- i) Desenvolvimento e validação de método para a determinação de multi-resíduos de quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL.
- ii) Desenvolvimento e validação de método para a confirmação de identidade e quantificação de multi-resíduos de quinolonas em carne de peixe por LC-ESI-MS/MS Q-ToF;
- iii) Otimização e validação de método para a determinação de OTC em ração, usando a HPLC-DAD;
- iv) Preparo de ração fortificada com OTC e quantificação do princípio ativo na mesma;
- v) Desenvolvimento e validação de método para a determinação de resíduos de OTC em carne de peixe por HPLC-FL;
- vi) Planejamento e realização do ensaio com tilápias visando o estudo de depleção;
- vii) Análise das amostras provenientes do ensaio e estabelecimento dos principais parâmetros de depleção.

---

---

# **CAPÍTULO III**

*DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
PARA A DETERMINAÇÃO DE MULTI-RESÍDUOS DE  
QUINOLONAS POR HPLC-FL E LC-MS/MS*

---

---

### III.1. Introdução

Para garantir a segurança dos consumidores, têm sido estabelecidos níveis de tolerância, ou limites máximos de resíduos para a presença de antimicrobianos em alimentos de origem animal, os quais incluem os níveis residuais de fármacos e de seus metabólitos que remanescem na carcaça animal ou nos alimentos de origem animal após o término da administração do medicamento. Os resíduos tornam-se um problema de segurança alimentar quando persistem a um nível acima do valor considerado seguro no momento do abate. Portanto, é fundamental que estejam disponíveis informações sobre níveis de resíduos em animais destinados ao consumo humano (ANADÓN & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

No mundo todo, com algumas variações, estão entre os antimicrobianos licenciados para uso em peixes: oxitetraciclina, quinolonas (ácido oxolínico, flumequina), amoxicilina, florfenicol, entre outros, sendo os dois primeiros os mais utilizados (WHO, 1999). Um ponto importante é o de que em alguns países existem regulamentações quanto ao uso desses medicamentos na piscicultura, porém ainda não efetivamente aplicadas; em outros países, nenhum regime de regulamentação existe. No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, instituído pela Portaria Ministerial nº 527 (15/08/1995), mesmo depois de uma atualização das atividades pela Portaria Ministerial nº 50 (20/02/2006) e nº 9 (30/03/2007), ainda não inclui a determinação de resíduos de quinolonas em pescado.

Dos diversos métodos analíticos relatados na literatura científica envolvendo determinação de quinolonas em peixe, muitos fazem uso da cromatografia líquida de alta eficiência associada à detecção por fluorescência e por espectrometria de massas. No entanto, não se tem disponível um método envolvendo HPLC-FL e/ou LC-MS/MS para multi-resíduos que envolva todas as mesmas quinolonas empregadas no presente trabalho. Dos procedimentos descritos envolvendo a técnica LC-MS/MS, foi encontrado apenas um trabalho com aplicação de instrumentação de MS, composta por analisador de massas do

tipo ToF, na análise de apenas três representantes desse grupo de antimicrobianos (ENR, AOX e FLM) em salmão (HERNANDO *et al*, 2006). Ainda, não foi encontrado qualquer trabalho que envolvesse a espécie tilápia – principal espécie comercializada no Brasil e no mundo - como alvo de análise de resíduos de quinolonas.

## III.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de métodos para a determinação de multi-resíduos de quinolonas (enrofloxacina – ENR, ciprofloxacina – CIP, danofloxacina – DAN, sarafloxacina – SAR, ácido oxolínico – AOX, e flumequina – FLM) em carne de peixe (tilápia), com o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência associada aos detectores de fluorescência e espectrometria de massas em tandem.

## III.3. Parte Experimental

### III.3.1. Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, composto por um sistema de bombeamento binário, modelo 1525 (Waters, EUA); injetor modelo 7725 (Rheodyne, EUA), com amostrador de 50  $\mu$ L; detector de arranjo de fotodiodos (DAD), modelo 2996 (Waters, EUA) associado em série com um detector de fluorescência multi-canal, modelo 2475 (Waters, EUA). A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional Millennium<sup>32</sup> versão 4.0. Alguns estudos foram realizados com o mesmo sistema cromatográfico acima, porém associado em série a um detector de fluorescência, modelo RF-10A (Shimadzu, Japão) e a um integrador, modelo Chrom Jet CH1 (Shimadzu, Japão).

Também foi utilizado outro equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA), modelo Q-Tof micro (Micromass), composto por um

sistema de bombeamento quaternário, um sistema de injeção automática, uma interface de ionização por eletrospray (ESI), e um espectrômetro de massas híbrido composto por dois analisadores de massas em série: quadrupolo (Q) e tempo de voo (“*time of flight*”, ToF). A aquisição de dados foi realizada mediante o programa computacional MassLynx (Waters, EUA).

No preparo de soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli-Q, modelo Academic (Millipore, EUA).

Para a desgaseificação da fase móvel e para o preparo de amostras foi empregado um banho de ultra-som modelo USC 700 (Unique Thorton, Brasil).

O pH das soluções foi ajustado com um pH-metro modelo OP-271 (Digimed DM-20, Brasil), empregando um eletrodo de vidro combinado.

No preparo de amostras foram utilizados um homogeneizador Ultra-Turrax, modelo T18 basic (IKA, Brasil), uma centrífuga Excelsius II (Fanem, Brasil) e um sistema a vácuo para extração em fase sólida com capacidade para 12 cartuchos (Alltech, EUA).

### **III.3.2. Colunas cromatográficas**

Para os estudos de separação cromatográfica, foram empregadas as seguintes colunas analíticas de fase reversa C<sub>18</sub>:

- Coluna analítica à base de sílica (LiChroCART 125 x 4 mm, 5 µm – Merck, Alemanha);
- Coluna analítica de fase estacionária de sílica híbrida XTerra-A (250 x 4,6 mm, 5 µm – Waters, EUA);
- Coluna analítica de fase estacionária de sílica híbrida XTerra-B (150 x 2,1 mm, 5 µm – Waters, EUA).

Em todos os testes foram usados a coluna de guarda XTerra C<sub>18</sub>, 20 x 3,9 mm, 5 µm (Waters, EUA).

### **III.3.3. Cartuchos de extração em fase sólida**

Nos estudos de preparo das amostras de carne de peixe foram avaliados três cartuchos de extração de fases reversas diferentes, um à base de sílica (C<sub>18</sub>) e dois com fases poliméricas:

- À base de sílica: BOND-ELUT (500 mg, 6 mL), Varian, EUA;
- À base polimérica: STRATA-X (500 mg, 6 mL), Phenomenex, EUA;
- À base polimérica: HLB-OASIS (500 mg, 6 mL), Waters, EUA.

### **III.3.4. Solventes e reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Foram utilizados NaOH, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, EDTA sódico (Titriplex®), fosfato monossódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) e ácido acético da marca Merck (Alemanha), ácido tricloroacético (ATCA) da Sigma (EUA). ACN e MeOH foram solventes de grau cromatográfico (Tedia, Brasil).

### **III.3.5. Preparo de soluções**

#### **III.3.5.1. Soluções estoques**

Os padrões comerciais utilizados foram: norfloxacin (NOR: 99,9 %, Kyorin Pharmac., Japão); hidrocloreto de sarafloxacin (SAR: 99,7 %, Riedel-de-Haën – Sigma-Aldrich, China); danofloxacin (DAN: 98 %, Pfizer, Brasil); ciprofloxacina e enrofloxacin (CIP e ENR: 98 %, Fluka Biochemica – Sigma-Aldrich, China), ácido oxolínico e flumequina (AOX e FLM: 98 %, Sigma, Alemanha).

A partir dos padrões comerciais, foram preparadas soluções estoques individuais na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> em MeOH.

Para o preparo das soluções estoques de NOR, CIP, DAN e ENR, aos 50 mg de cada padrão foram adicionados 0,50 mL de ácido acético glacial, e os volumes foram completados para 50 mL com MeOH.

Para o preparo das soluções estoques de SAR, AOX e FLM, aos 50 mg de cada padrão foram adicionados 0,50 mL (para SAR) e 1,0 mL (para AOX e FLM) de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , e os volumes foram então completados para 50 mL com MeOH.

Conforme recomendações da literatura, as soluções estoques das quinolonas foram armazenadas em frascos âmbar, mantidas em freezer ( $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ), e foram utilizadas por um período de até 3 meses (ROUDAUT & YORKE, 2002; TOUSSAINT *et al*, 2005).

### ***III.3.5.2. Soluções de trabalho***

As soluções de trabalho dos antimicrobianos na concentração de  $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  e abaixo desta foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções estoques com uma solução aquosa de ácido oxálico  $0,010\text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0.

### ***III.3.6. Amostras branco de peixe***

As amostras branco de peixes utilizadas foram da espécie tilápia, adquiridas no mercado da cidade de Campinas/SP. As amostras de filé de tilápias foram armazenadas em freezer ( $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ).

## **III.4. Procedimento Analítico**

### ***III.4.1. Método Para a Determinação de Quinolonas em Carne de Peixe por HPLC-FL***

#### ***III.4.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico***

A separação cromatográfica das quinolonas (CIP, DAN, ENR, SAR, AOX e FLM) empregadas nos estudos de determinação de seus resíduos na carne de peixe, fazendo uso de NOR como padrão interno, foi otimizada usando

cromatografia líquida de alta eficiência associada a detector de arranjo de diodos (DAD) e fluorescência (FL) conectados em série (HPLC-DAD-FL). Duas fases estacionárias de modo reverso (C<sub>18</sub>) foram testadas, uma à base de sílica (LiChroCART 150 x 4 mm, 5 µm Merck, Alemanha) e outra de composição de sílica híbrida (XTerra-A: 250 x 4,6 mm, 5 µm Waters, EUA). Sempre se fez uso da coluna de guarda XTerra C<sub>18</sub> (20 x 3,9 mm, 5 µm, Waters, EUA). As diferentes composições avaliadas para a fase móvel consistiram de mistura de solução aquosa 0,010 mol L<sup>-1</sup> de ácido oxálico (pH 4,0), em associação com modificadores orgânicos: MeOH ou ACN. Foram também feitas comparações entre os sistemas de detecção por absorção no UV (DAD) e FL. Para a detecção das quinolonas, o detector DAD permitiu a seleção dos comprimentos de onda de máxima absorbância para cada um dos analitos, enquanto que para a detecção por FL, também objetivando o monitoramento dos analitos em suas melhores condições de fluorescência, foram empregados os comprimentos de onda  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  de 280/450 nm para NOR, CIP, DAN, ENR e SAR; e 327/367 nm para AOX e FLU, conforme sugerido na literatura (ROUDAUT & YORK, 2002). Uma alça de amostragem para um volume de injeção de 50 µL foi empregada.

As condições de separação cromatográfica foram avaliadas a partir dos parâmetros de conformidade do sistema, preconizando como sendo adequados ao objetivo do método as faixas de valores apresentadas na Tabela III.1.

**Tabela III.1** - Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros cromatográficos.

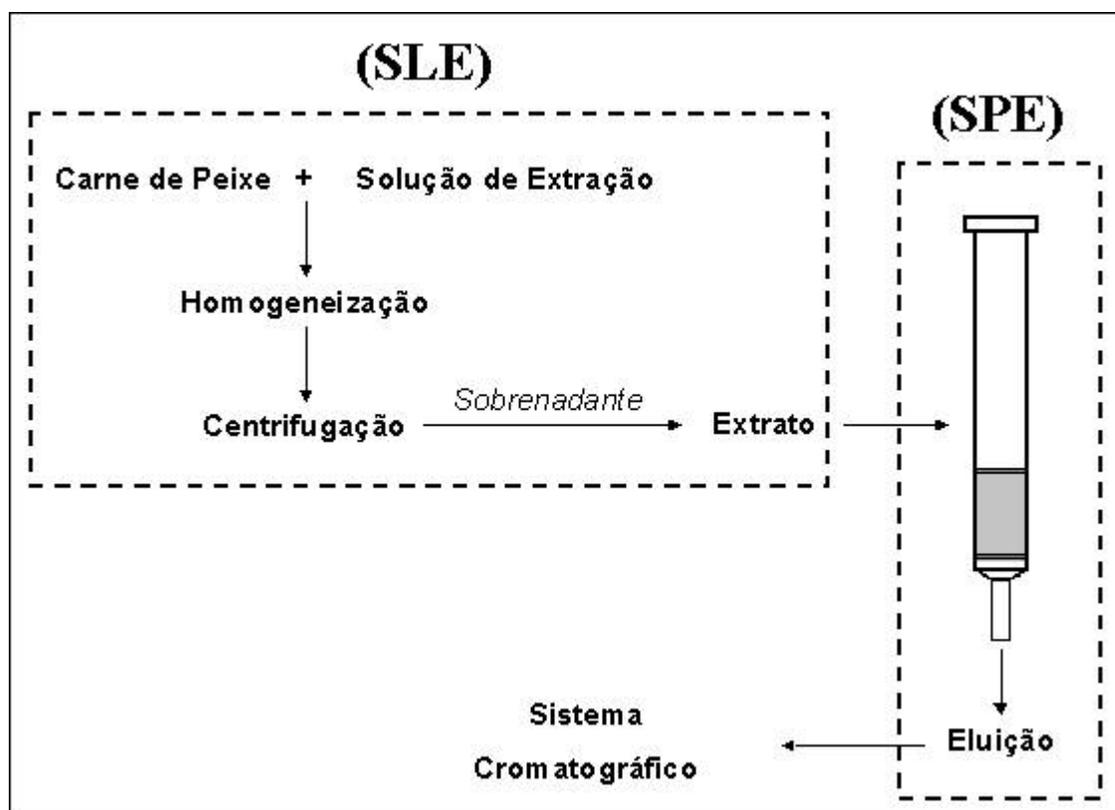
PARÂMETROS	CONDIÇÃO ADEQUADA
Fator de Retenção (k)	1 < k < 10
Fator de Separação ( $\alpha$ )	$\alpha > 1,1$
Resolução (Rs)	Rs > 1,25
Número de Pratos (N)	N > 2000

Os valores dos parâmetros cromatográficos  $k$  e  $N$  da Tabela III.1 foram baseados nas recomendações de SHABIR (2003) para análise de fármacos, adotando-se as mesmas faixas de valores. Com relação ao fator de separação ( $\alpha$ ), optou-se por estabelecer apenas um valor mínimo para esse parâmetro, sem definir um limite superior como apontado por SHABIR (2003) ( $1,1 < \alpha < 1,4$ ). Para  $R_s$ , tomou-se como base que o valor superior a 1,25 é suficiente para fins quantitativos, conforme COLLINS *et al* (2005).

#### **III.4.1.2. Preparo de amostra de carne de peixe**

O preparo de amostra de carne de peixe desenvolvido para a determinação das quinolonas por HPLC-FL se baseou principalmente na extração sólido-líquido (LSE), tomando como condições iniciais às descritas em SILVA (2004), abrangendo um estudo da composição da solução extratora empregada, composta por uma mistura de solução 10 % de ácido tricloroacético (ATCA) e solvente orgânico (MeOH ou ACN) em diferentes proporções. Também foram testadas diferentes quantidades de amostra (carne de tilápia) empregadas no processo (0,5, 1 e 2 g). Como procedimento geral de preparo, iniciando o processo com uma primeira etapa envolvendo extração sólido-líquido (LSE), a amostra foi homogeneizada com a solução de extração em Ultra-Turrax, colocada em ultra-som por 10 minutos para promover uma melhor interação da solução extratora com a matriz, seguida de centrifugação. O sobrenadante foi então separado, e ao precipitado foram adicionados mais 5 mL da solução extratora, repetindo-se então o procedimento LSE. As duas fases sobrenadantes obtidas foram combinadas e encaminhadas para o procedimento de limpeza do extrato (*clean-up*) por extração em fase sólida (SPE). Para esta etapa foram testados três cartuchos SPE comerciais, sendo um deles de fase estacionária à base de sílica, e dois à base polimérica, todos com princípio de fase reversa. O procedimento de SPE seguiu: condicionamento com 5 mL de MeOH e 5 mL de água; aplicação do extrato obtido de LSE; lavagem do cartucho com 10 mL de água. A eluição das quinolonas do cartucho SPE foi outra etapa estudada, comparando-se os

resultados obtidos pelo uso de eluição ácida (5 mL da solução ACN:ácido acético glacial, 8:2, v/v) com os obtidos pela eluição básica (5 mL da solução ACN:NH<sub>4</sub>OH, 8:2, v/v). O eluato foi evaporado sob fluxo suave de nitrogênio, em banho-maria (~ 45 °C), e finalmente ressuspendido em 1 mL de ácido oxálico 0,010 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0), seguido de filtração em membrana de 0,22 μm. Uma alíquota de 50 μL dessa solução foi injetada no sistema cromatográfico. Um esquema geral, com apontamentos das principais etapas envolvidas no preparo de amostra é ilustrado pela Figura III.1.



**Figura III.1** - Esquema geral da etapa de preparo de amostra para extração da quinolonas de carne de peixe.

Para a avaliação das condições estudadas no procedimento de preparo de amostra foram analisadas as eficiências de extração e limpeza de todos os analitos envolvidos, inclusive do padrão interno selecionado. Todos os testes

foram feitos em duplicatas, e os resultados apresentados como média das mesmas.

A fortificação da amostra de carne de peixe foi realizada com os analitos (solução padrão) antes de se iniciar cada procedimento de preparo da amostra testado. Os resultados obtidos para cada uma das quinolonas foram avaliados pelas respectivas curvas analíticas externas (obtidas fora da matriz), desenvolvidas com os analitos em soluções padrão. Esses resultados foram transformados em porcentagens das concentrações adicionadas na etapa de fortificação, isto é, porcentagens das concentrações das respectivas soluções padrão usadas na fortificação da amostra. Todos os testes foram desenvolvidos em duplicatas.

O procedimento de preparo de amostra foi avaliado e otimizado objetivando-se promover a máxima eficiência de extração e a maior eliminação de interferentes possíveis.

#### **III.4.1.3. Validação do método analítico**

Para a validação do método desenvolvido para a determinação das quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), tendo como referência, principalmente, as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2003) e Comunidade Européia (EC, 2002) para análise de resíduos em alimentos.

##### **III.4.1.3.1. Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos na análise de amostras branco e para amostra branco fortificada com as quinolonas em concentrações correspondentes aos níveis P3 das respectivas curvas analíticas (Tabela III.2), submetidas ao processo de extração descrito na Figura III.7 (p.69), com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes

da matriz que pudessem comprometer a determinação de cada um dos antimicrobianos. Como critério de aceitação foi estabelecido que as repostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos deveriam ser inferiores a 20 % das repostas dos respectivos limites de quantificação.

#### III.4.1.3.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

Para a quantificação das quinolonas por HPLC-FL foram elaboradas curvas analíticas fortificando amostras branco em cinco níveis de concentração (P1, P2, P3, P4 e P5) de cada analito conforme apresentado na Tabela III.2. Como padrão interno foi empregada a NOR, considerando que este é um representante das fluoroquinolonas que não é prescrito para uso veterinário e que, portanto, tem uma menor probabilidade de estar presente na carne de peixe. Para a fortificação foram usados 2,0 g de amostra branco aos quais foram acidionados 1 mL das soluções de trabalho dos analitos diluídas em solução de ácido oxálico 0,010 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) de modo a se obter as concentrações apontadas na Tabela III.2.

**Tabela III.2** - Níveis de fortificação empregados para obtenção das curvas analíticas para quantificação das quinolonas, empregando a NOR como padrão interno.

NÍVEL	CONCENTRAÇÃO (ng g <sup>-1</sup> )						
	NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
<b>P1</b>	150	50	25	50	15	50	100
<b>P2</b>	150	100*	50	100*	30*	100*	200
<b>P3</b>	150	150	75	150	45	150	300
<b>P4</b>	150	200	100*	200	60	200	400
<b>P5</b>	150	300	150	300	90	300	600*

\* Concentrações correspondentes ao LMR de cada quinolona em carne de peixe.

As linearidades (coeficientes de correlação linear,  $r$ ) e as sensibilidades (coeficientes angulares) do método para a determinação de cada uma das quinolonas foram obtidas através das respectivas curvas analíticas.

#### III.4.1.3.3. Limite de Detecção (LOD)

Os limites de detecção (LOD) para cada uma das quinolonas foram determinados a partir da razão sinal/ruído igual a 3, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco de carne de peixe ( $n = 3$ ), e os resultados são apresentados como valores médios das repetições.

#### III.4.1.3.4. Limite de Quantificação (LOQ)

Os limites de quantificação (LOQ) para cada uma das quinolonas foram determinados a partir da razão sinal/ruído igual a 10, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco de carne de peixe ( $n = 3$ ), e os resultados são apresentados como valores médios das repetições.

#### III.4.1.3.5. Precisão

A precisão obtida para cada uma das quinolonas foi avaliada em situação de intra- e inter-ensaios.

A precisão intra-ensaios foi obtida para um nível de concentração (P3, Tabela III.2, p.50) de cada quinolona, mediante fortificação de amostras branco, analisadas em quintuplicatas ( $n = 5$ ), em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressas como as estimativas dos desvios padrão relativos (RSD).

A precisão inter-ensaios foi obtida para três níveis de concentração (P2, P3 e P4, Tabela III.2, p.50) de cada analito, mediante fortificação de amostras branco, realizadas em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo

mesmo analista, no mesmo equipamento, e os resultados foram expressos como as estimativas dos desvios padrão relativos (RSD).

#### *III.4.1.3.6. Exatidão*

A exatidão obtida para cada uma das quinolonas pelo método foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tanto, amostras branco foram fortificadas com as quinolonas em concentrações correspondentes aos terceiros níveis das respectivas curvas analíticas (P3) (Tabela III.2, p.50), e os resultados transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos, após desenvolvimento do procedimento de extração. Foram realizadas três repetições (n = 3).

### ***III.4.2. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por LC-MS/MS***

#### ***III.4.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico***

A cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em tandem (LC-ESI-MS/MS Q-ToF) foi empregada para a confirmação das identidades das quinolonas nas amostras de carne de peixe, compondo uma ferramenta complementar ao método quantitativo desenvolvido por HPLC-FL, além de também ter sido estudado, paralelamente, como um outro método quantitativo para esses mesmos analitos. O estudo da separação cromatográfica das quinolonas nesse sistema teve como base as condições pré-definidas para a separação dos compostos pelo sistema HPLC-FL, empregando uma coluna analítica semelhante, porém de comprimento e diâmetro interno menores (XTerra-B: 150 x 2,1 mm, 5 µm Waters-EUA). A fase móvel foi composta por ACN e água, ambos os componentes com 0,10 % v/v de ácido acético, sob eluição por gradiente.

Para o estabelecimento das condições do espectrômetro de massas para a quantificação e identificação foram realizadas infusões das soluções padrão das quinolonas ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no equipamento.

Como critério básico para a seleção das condições de separação cromatográfica pelo sistema LC-MS/MS Q-ToF, estabeleceu-se que os valores dos parâmetros cromatográficos só seriam avaliados em caso de ocorrer um comprometimento da seletividade do espectrômetro de massas em relação aos analitos, a ponto de comprometer a identificação e/ou quantificação das quinolonas estudadas. Nesse caso, os valores para os parâmetros cromatográficos preconizados seriam os mesmos adotados para a avaliação do método desenvolvido empregando HPLC-FL ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ).

#### **III.4.2.2. Preparo de amostra de carne de peixe**

O procedimento de preparo de amostra de carne de peixe desenvolvido para a confirmação de identidade ou para a quantificação das quinolonas por LC-MS/MS foi o mesmo estabelecido para o método com determinação por HPLC-FL.

#### **III.4.2.3. Validação do método analítico**

É importante ressaltar que a técnica de LC-MS/MS foi estudada para compor uma etapa complementar ao método desenvolvido para quantificação das quinolonas por HPLC-FL, contribuindo para a confirmação de identidade dos analitos. No entanto, a técnica LC-MS/MS também foi estudada como um método quantitativo para os mesmos analitos.

Sendo assim, todo o procedimento de análise por LC-MS/MS com o objetivo quantitativo, também passou pelo mesmo procedimento de validação descrito para validação do método empregando HPLC-FL (item III.4.1.3, p.49), sendo avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho,

linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), tendo com base as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2003) e Comunidade Européia (EC, 2002) para análise de resíduos em alimentos.

A elaboração das curvas analíticas, os níveis de concentração de cada quinolona E o padrão interno empregado foram os mesmos descritos para o método empregando HPLC-FL (Tabela III.2, p.50).

Todos os parâmetros de validação foram avaliados da mesma forma empregada para a outra técnica cromatográfica, conforme descrito no item III.4.1.3 (p.49), além de ter sido avaliado também o efeito matriz.

Para a avaliação do efeito matriz no presente trabalho, amostras branco de carne de peixe foram submetidas ao processo de preparo de amostra, conforme descrito pela Figura III.7 (p.69). Após o procedimento de preparo, a etapa final de ressuspensão dos analitos após o processo de evaporação por fluxo de  $N_2$  (~ 45 °C), foi feita em 1,0 mL de uma solução aquosa 0,010 mol L<sup>-1</sup> de ácido oxálico (pH 4,0), contendo as quinolonas nas concentrações correspondentes ao terceiro nível das respectivas curvas analíticas (Tabela III.2, p.50).

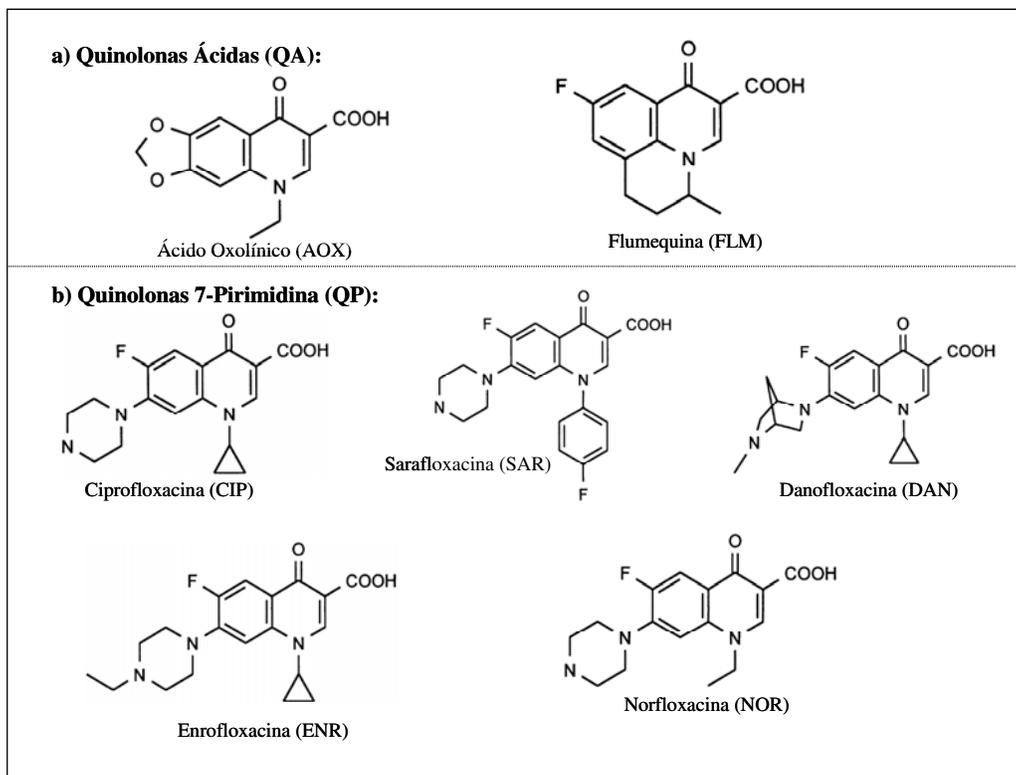
Os resultados obtidos para cada uma das quinolonas foram quantificados por curvas analíticas obtidas com os analitos em solução padrão, isto é, fora da matriz. As concentrações obtidas foram então convertidas em porcentagens das concentrações esperadas para cada uma das quinolonas, e a diferença desses valores para o 100 %, foi chamado de efeito matriz.

### **III.5. Resultados e Discussão**

#### ***5.1. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL***

Conforme já apresentado no item I.7.1 (p.17), as quinolonas podem ser divididas em dois grupos: quinolonas ácidas (QA) e quinolonas 7-piperazinil (QP). As estruturas moleculares das quinolonas empregadas nos estudos do presente

trabalho, bem como a discriminação a que grupo pertencem, pode ser visto na Figura III.2.



**Figura III.2 - Estruturas moleculares das quinolonas estudadas.**

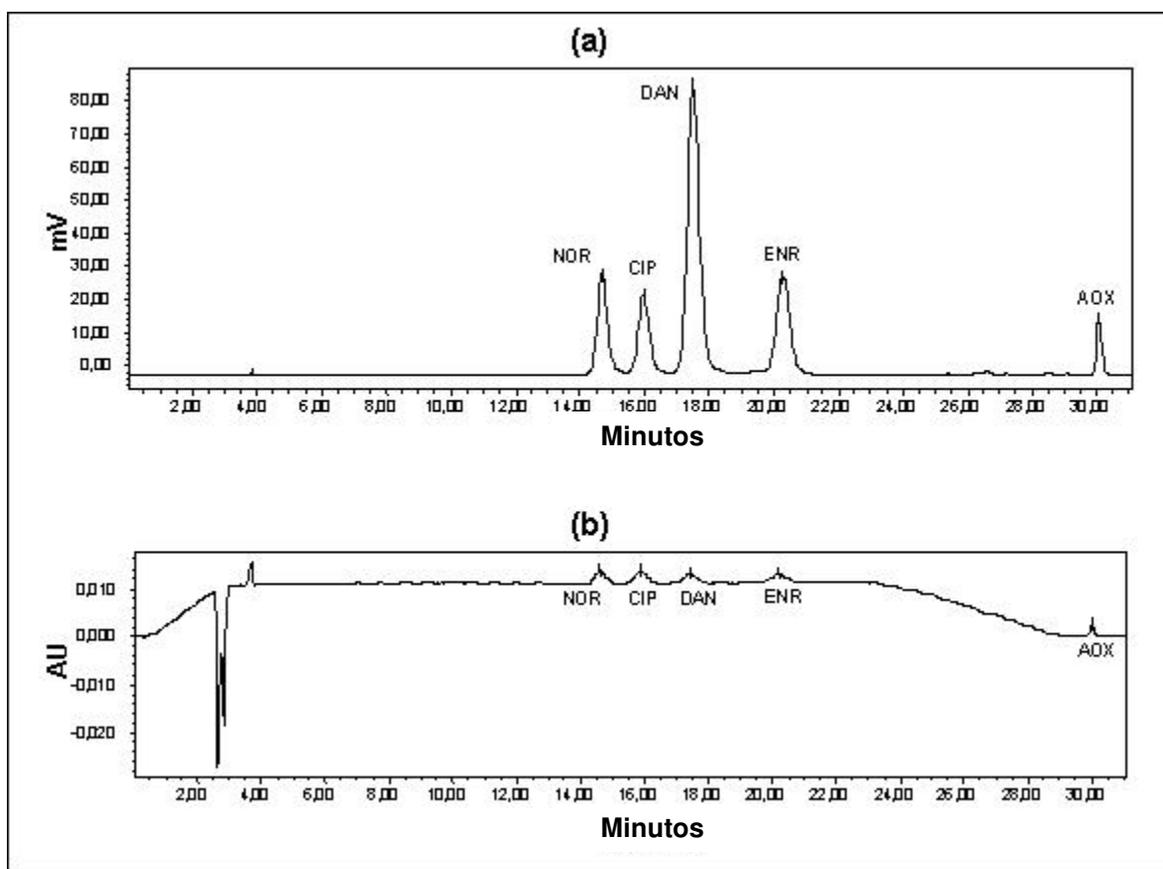
### **III.5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico**

#### **III.5.1.1.1. Detecção por fluorescência**

Conforme já discutido no item I.7.1 (p.17), as quinolonas podem ser monitoradas tanto por detector de arranjo de diodos como de fluorescência. Cabe destacar que a fluorescência molecular depende fortemente do pH do meio. Espécies aniônicas geralmente não apresentam fluorescência nativa, de modo que a maior intensidade de fluorescência é obtida em pH no intervalo de 2,5 a 4,5. Nestes valores de pH, espécies neutras e catiônicas prevalecem para quinolonas ácidas (QA: AOX e FLM) e quinolonas piperazinil (QP: NOR, CIP, DAN, ENR e

SAR), respectivamente. Para QA, comprimentos de onda  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  situam-se entre 325 e 360 nm, respectivamente. Para QP, as combinações recomendadas são 275-280 e 440-450 nm, respectivamente (HERNÁNDEZ-ARTESERVOS *et al*, 2002).

Para a seleção do sistema de detecção entre DAD e por fluorescência a ser empregado na determinação das quinolonas a níveis residuais de concentração, foram feitos testes com soluções padrões de algumas quinolonas (NOR, CIP, DAN, ENR e AOX), todas na concentração de  $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sob monitoração por ambas as técnicas de detecção. Os resultados são apresentados pela Figura III.3.



**Figura III.3** - Cromatogramas da separação de quinolonas NOR, CIP, DAN, ENR e AOX (todas a  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) sob monitoração por (a) fluorescência ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ : 325/450 nm); e (b) DAD: 279,2 nm. FE: XTerra-A, FM: FA (ácido oxálico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0), FO (ACN). Eluição por gradiente linear: 90 % de FA e 10 % de FO de 0 a 23 min; mudando para 50 % de FA e 50 % de FO de 23 a 29 min. Vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

A detectabilidade por FL se comprovou superior a obtida pelo detector DAD, o qual foi, então, selecionado para compor o método de determinação das quinolonas em carne de peixe no nível de resíduos (ordem de  $\text{ng g}^{-1}$ ).

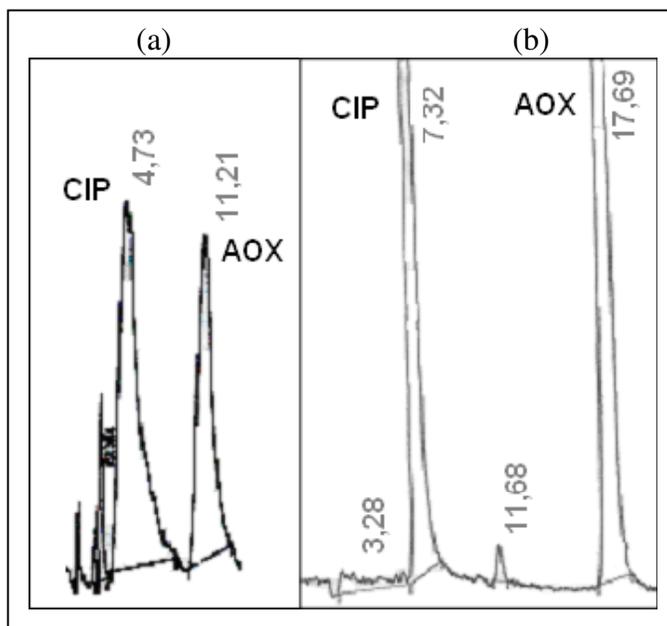
Conforme já discutido, a fluorescência depende da estrutura molecular, e os comprimentos de onda  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$  não são os mesmos para os analitos dos grupos das quinolonas ácidas (QA) e quinolonas 7-piperazinil (QP). Diante disto, foram selecionados os comprimentos de onda de 325 nm ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) e 450 nm ( $\lambda_{\text{em}}$ ) como compromisso inicial entre detectabilidade e fluorescência para todas, pois durante o período desses testes iniciais de avaliação da separação cromatográfica das quinolonas por HPLC-FL, o detector modelo (Waters, EUA) não apresentava os dois canais de captação de sinal ativos, de modo que ainda não se fazia possível o monitoramento simultâneo em uma mesma corrida cromatográfica sob condições ótimas de fluorescência para a detecção de QA e de QP.

#### *III.5.1.1.2. Fase estacionária*

Conforme o item I.7.1 (p.17), as colunas analíticas de fase reversa à base de sílica resultam em problemas de assimetria dos picos cromatográficos devido à presença de grupos silanóis residuais e impurezas metálicas dos materiais de recheio dessas colunas ( $\text{C}_{18}$  ou  $\text{C}_8$ ), principalmente quando se envolve as quinolonas anfóteras (QP). As colunas analíticas poliméricas são alternativas para se obter picos cromatográficos com melhor simetria, no entanto, essas são menos eficientes quando comparadas com as colunas à base de sílica. Neste sentido o uso de fase de sílica híbrida se apresenta vantajoso. Sendo assim, foram comparados os resultados de separação cromatográfica empregando-se uma coluna à base de sílica (LiChroCART, 125 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), e outra de fase híbrida (XTerra-A: 250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), ambas de fase reversa ( $\text{C}_{18}$ ). Entre as fases estacionárias avaliadas com diferentes fases móveis, a combinação que apresentou os melhores parâmetros cromatográficos em relação à resolução, fator de simetria e eficiência foi a coluna analítica de fase híbrida (XTerra, Waters, EUA) com uma fase móvel composta por ácido oxálico 0,010 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 4,0 e ACN.

Para fins ilustrativos, a Figura III.4 apresenta os cromatogramas obtidos para a separação de CIP e AOX nas colunas analíticas LiChroCART e XTerra.

Os cromatogramas evidenciam uma superioridade na qualidade da separação obtida para CIP e AOX quando do emprego da coluna de fase híbrida XTerra-A, de modo que essa foi a fase estacionária escolhida para os estudos subsequentes.



**Figura III.4** - Cromatogramas da separação da CIP e do AOX (ambos a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) registrados pelo sistema composto pelo detector de fluorescência e integrador Chrom Jet CH1, ambos da marca Shimadzu (Japão) ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ : 325/450 nm), com o uso da fase móvel composta por ácido oxálico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,0, nas colunas analíticas: (a) LiChroCART 125 x 4 mm,  $5 \mu\text{m}$  (Merck, Alemanha); (b) XTerra-A: 250 x 4 mm,  $5 \mu\text{m}$  (Waters, EUA). FM: FA (ácido oxálico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0), FO (ACN). Eluição isocrática: 75 % de FA e 25 % FO.

#### III.5.1.1.3. Fase móvel

A composição da fase móvel é estreitamente relacionada à fase estacionária em uso.

A grande maioria dos métodos de HPLC com fase estacionária reversa para determinação de quinolonas faz uso de misturas contendo ACN ou MeOH, ou

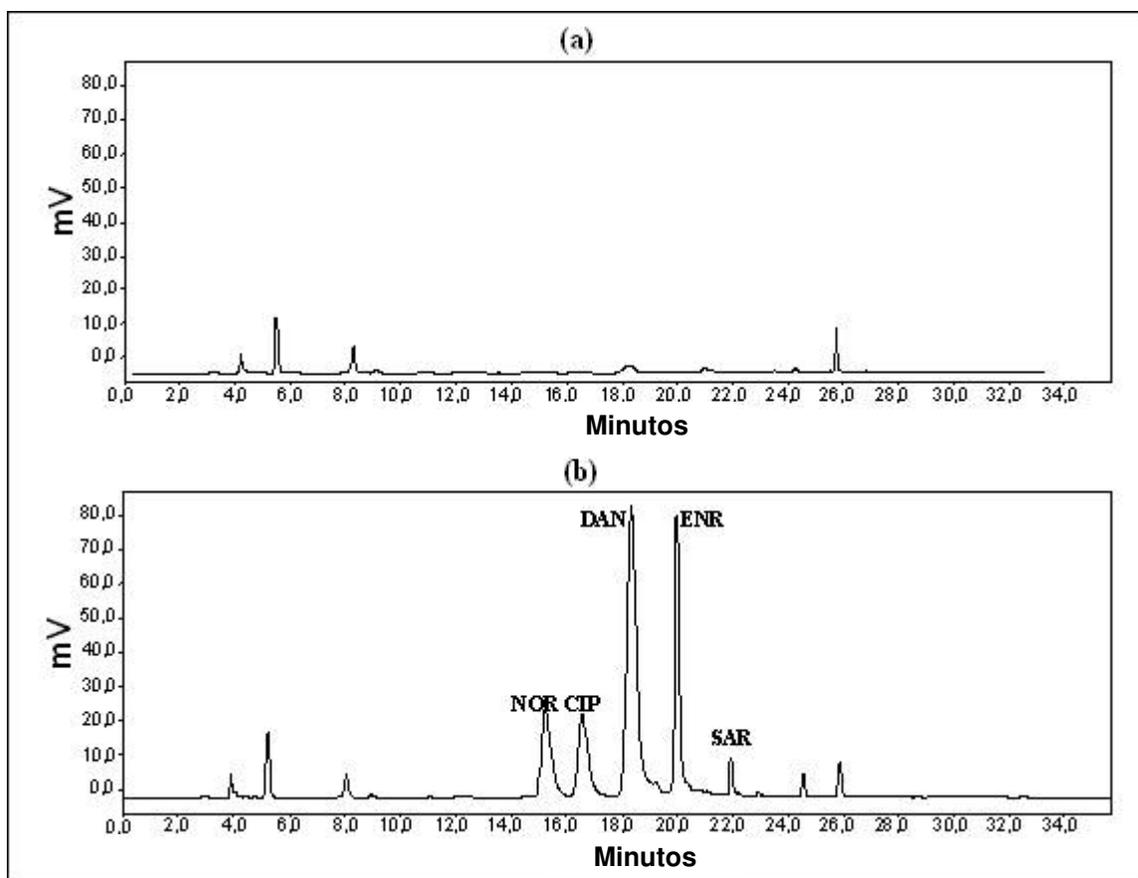
uma mistura de ambos os solventes como modificador orgânico, com soluções aquosas. Ainda com o objetivo de melhorar a simetria dos picos cromatográficos, agentes redutores de cauda do pico são adicionados. O pH normalmente é mantido entre 2 e 4, para que haja uma redução da ionização de silanóis e minimizar suas interações com as quinolonas, que no caso estão presentes como espécies catiônicas (QP). Embora soluções de tampão fosfato (YORKE & FROC, 2000; SU *et al*, 2003; RAMOS *et al*, 2003) sejam utilizadas para esse ajuste de pH, outras soluções, tais como tampão cítrico (BAILAC *et al*, 2004), ácido fosfórico (ROUDAUT & YORKE, 2002<sup>a,b</sup>) ou ácido oxálico (MERÁS *et al*, 1998; SAMUELSEN *et al*, 2000; HERNÁNDEZ-ARTESEROS *et al*, 2002<sup>b</sup>) são também usadas.

Diante do discorrido acima, para o presente estudo, foi avaliado o emprego de ACN (fase orgânica, FO) e ácido oxálico 0,010 mol L<sup>-1</sup> em pH 4,0 (fase aquosa, FA) para a separação de NOR, CIP, DAN, ENR, SAR, AOX E FLM na coluna XTerra-A.

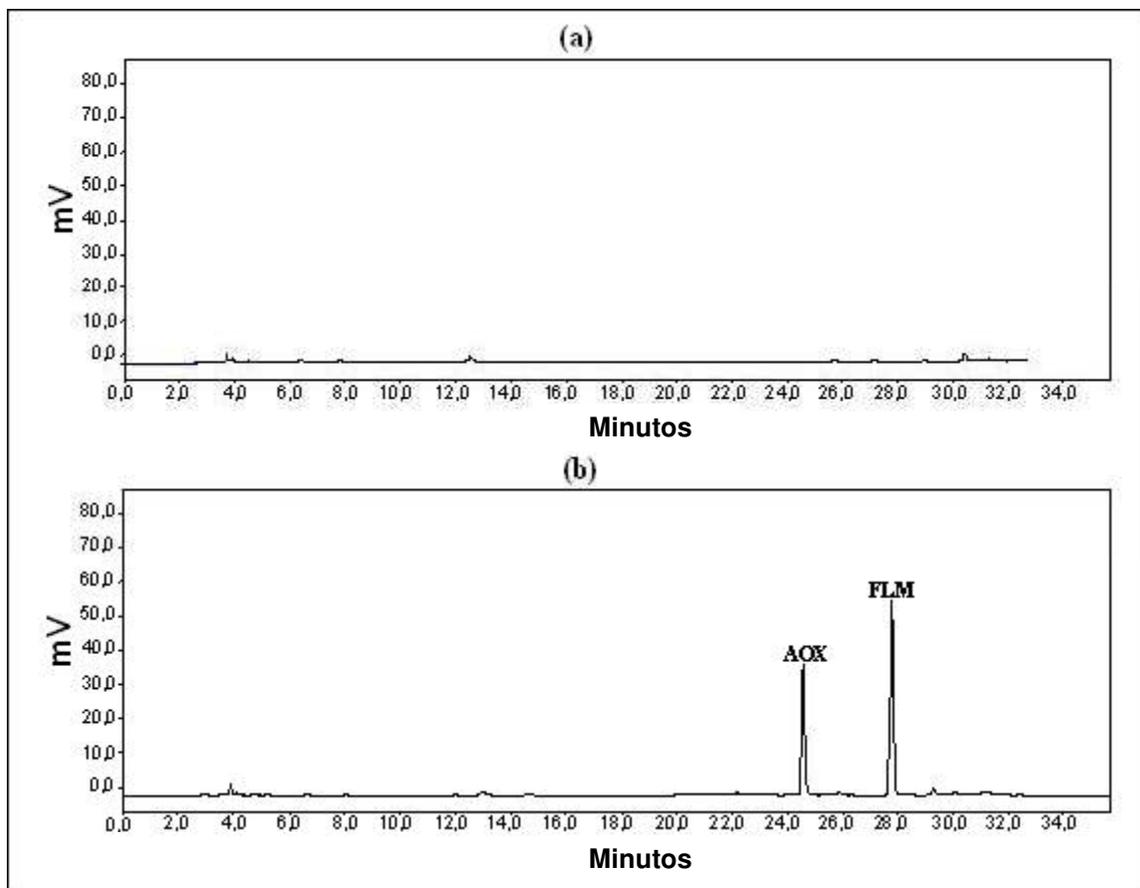
Os estudos revelaram que a eluição isocrática não promoveu uma separação adequada de todas as quinolonas sob estudo em um tempo razoável de análise. Foi verificado que o AOX e FLM apresentam uma afinidade muito maior pela fase estacionária do que as demais quinolonas, o que leva a um tempo de retenção muito longo destas, prejudicando o tempo de análise. Desta forma, para otimizar o tempo de análise e garantir a separação das quinolonas foi necessário empregar um gradiente de eluição. Após vários estudos, foi selecionado o seguinte gradiente linear de eluição sob vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>: 86 % de FA e 14 % de FO de 0 a 15 min.; mudando para 41 % de FA e 59 % de FO de 15 a 30 min; voltando à proporção inicial de 30 a 35 min, e se mantendo nessa proporção até 40 min. Nesta fase do estudo, o laboratório já dispunha do detector de fluorescência com a função multi- $\lambda$  (Waters, EUA) ativa, e uma programação do equipamento foi possível para que os analitos pudessem ser detectados na sua melhor condição de fluorescência:  $\lambda_{exc}$ : 327 nm e  $\lambda_{em}$ : 367 nm para a detecção de NOR, CIP, DAN, ENR e SAR; e  $\lambda_{exc}$ : 280 nm e  $\lambda_{em}$ : 450 nm para AOX e FLM.

As Figuras III.5 e III.6 apresentam os cromatogramas característicos obtidos de amostra branco de carne de peixe e de amostra branco fortificada com as quinolonas às concentrações correspondentes ao quarto nível (P4) das respectivas curvas analíticas, o que permite uma avaliação da seletividade do método. Os cromatogramas da Figura III.5 foram monitorados por fluorescência nas condições de 280/450 nm ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ ), adequadas para a detecção da NOR, CIP, DAN, ENR e SAR. Os cromatogramas da Figura III.6 foram monitorados também por fluorescência, porém nas condições mais adequadas para a detecção do AOX e da FLM ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ : 327/367 nm). A partir dos cromatogramas fica comprovada a seletividade do método, isto é, não há interferentes da matriz (amostra branco) que coeluem com os analitos de modo que possam interferir na identificação e/ou quantificação dos mesmos.

O preparo de amostras empregado nesta fase do experimento ainda não havia sido otimizado, de modo que as etapas envolvidas foram baseadas nas condições descritas em SILVA (2004), seguindo o esquema da Figura III.1 (p.48), empregando: quantidade de amostra (carne de peixe) de 1,0 g; solução extratora: 10 mL de uma solução de 10 % de ácido tricloroacético (ATCA) com MeOH na proporção 80:20 (v/v); cartucho de SPE: BOND ELUT, 500 mg, 6 mL; solução de eluição das quinolonas dos cartuchos SPE: 2 x 5 mL da solução 20 % de HAc em ACN. Os estudos do procedimento de preparo de amostra serão mais bem discutidos no item III.5.1.2 (p.64).



**Figura III.5** - Cromatogramas característicos para (a) amostra branco e (b) amostra branco fortificada com NOR, CIP, ENR, AOX (todas a  $200 \text{ ng g}^{-1}$ ), DAN ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ), SAR ( $60 \text{ ng g}^{-1}$ ) e FLM ( $400 \text{ ng g}^{-1}$ ). FE: XTerra-A, FM: FA (ácido oxálico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0), FO (ACN). Eluição por gradiente linear: 86 % de FA e 14 % de FO de 0 a 15 min; mudando para 41 % de FA e 59 % de FO de 15 a 30 min; voltando à proporção inicial de 30 a 35 min, e se mantendo nessa proporção até 40 min. Vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ): 280/450 nm.



**Figura III.6** - Cromatogramas característicos para (a) amostra branco e (b) amostra branco fortificada com NOR, CIP, ENR, AOX (todas a  $200 \text{ ng g}^{-1}$ ), DAN ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ), SAR ( $60 \text{ ng g}^{-1}$ ) e FLM ( $400 \text{ ng g}^{-1}$ ). FE: XTerra-A, FM: FA (ácido oxálico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0), FO (ACN). Eluição por gradiente linear: 86 % de FA e 14 % de FO de 0 a 15 min.; mudando para 41 % de FA e 59 % de FO de 15 a 30 min; voltando à proporção inicial de 30 a 35 min, e se mantendo nessa proporção até 40 min. Vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ): 327/367 nm.

Devido à semelhança nas propriedades físico-químicas da NOR, CIP, DAN e ENR, a separação na coluna de fase reversa em um menor tempo de corrida foi possível no modo isocrático na proporção 86 % de FA e 14 % de FO. Para a eluição de FLM e AOX, que têm caráter mais apolar do que as anteriores, foi necessário aumentar a força da fase móvel para permitir a eluição em um menor tempo possível. Sendo assim, foi empregada eluição isocrática até 15 min e após esse tempo foi usado um gradiente de eluição aumentando a proporção da FO. Para o estabelecimento do gradiente, estabeleceu-se que a variação do

percentual dos componentes da fase móvel não deveria ultrapassar 3 % min<sup>-1</sup>, com o objetivo de se evitar uma mudança mais brusca da força da fase móvel ao longo de uma mesma corrida, para que a mesma não pudesse ter problemas de repetibilidade. Apesar de o gradiente de retorno da fase móvel às proporções iniciais de FA:FO ter sido de uma variação maior (9 % min<sup>-1</sup>), estabeleceu-se um período de 5 min (35 a 40 min) para o condicionamento da coluna até a próxima injeção.

Com relação à obtenção dos parâmetros cromatográficos relativos, que são aqueles que permitem a avaliação da qualidade de separação dos analitos, como o fator seletividade ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ), os valores foram sempre calculados para um determinado pico cromatográfico em relação ao pico adjacente de tempo de retenção maior. Como a corrida cromatográfica de separação das quinolonas ocorreu sob detecção de fluorescência em dois canais diferentes ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ : 280/450 nm e 327/367 nm), a obtenção e avaliação dos parâmetros cromatográficos foram feitas para os cromatogramas isolados, conforme apresentados na Figura III.5(b) e III.6(b).

A Tabela III.3 apresenta os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para as condições selecionadas, obtidos através do programa *System Suitability* (software Millennium 3.2, Waters, EUA). Os resultados indicam que as condições estabelecidas são consideradas adequadas para os objetivos a que se propõe o método conforme previamente preconizado ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ).

**Tabela III.3** - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.

	QUINOLONAS	$t_R$ (min)	$R_s$	$F_s$	$\alpha$	$k$	$N$
1	NOR	14,59	-	1,09	-	4,83	4773
2	CIP	15,99	2,22	1,15	1,12	5,39	3594
3	DAN	17,66	2,57	1,34	1,12	6,06	3039
4	ENR	20,35	5,45	1,33	1,17	7,14	20392
5	SAR	22,69	4,04	1,28	1,13	8,07	16305
6	AOX	25,42	-	1,09	-	9,17	21013
7	FLM	28,75	9,71	1,08	1,14	10,05	12250

**Condições:** amostra branco fortificada com NOR, CIP, ENR, AOX (todas a  $150 \text{ ng mL}^{-1}$ ), DAN ( $75 \text{ ng mL}^{-1}$ ), SAR ( $45 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e FLM ( $300 \text{ ng mL}^{-1}$ ). FE: XTerra-A, FM: FA (ácido oxálico  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,0), FO (ACN). Eluição por gradiente linear: 86 % de FA e 14 % de FO de 0 a 15 min.; mudando para 41 % de FA e 59 % de FO de 15 a 30 min; voltando à proporção inicial de 30 a 35 min, e se mantendo nessa proporção até 40 min. Vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Fluorescência ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ ): 280/450 nm (NOR, CIP, DAN, ENR e SAR) e 327/367 nm (AOX e FLM).

### **III.5.1.2. Preparo de amostra de carne de peixe**

Baseado nas informações apresentadas no item I.7.1 (p.17), o preparo da amostra de carne de peixe envolveu etapas de extração das quinolonas por procedimentos de extração sólido-líquido (LSE) e limpeza do extrato (*clean-up*) utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE).

Como referência, os testes iniciais para o desenvolvimento desta etapa do trabalho foram baseados nas condições descritas em SILVA (2004), que desenvolveu um método para extração de algumas quinolonas em carne de frango.

Os testes iniciais de preparo de amostra de carne de peixe para a extração das quinolonas, e usados como a primeira referência para avaliação dos testes subseqüentes, ocorreram nas seguintes condições: quantidade de amostra (carne de peixe): 1,0 g; solução extratora: 10 mL de uma solução de 10 % de ácido tricloroacético (ATCA) com MeOH na proporção 80:20 (v/v); cartucho de SPE:

BOND ELUT C<sub>18</sub>, 500 mg, 6 mL; solução de eluição das quinolonas dos cartuchos SPE: 2 x 5 mL da solução contendo 20 % de HAc em ACN.

Os resultados das eficiências de extração obtidos para os analitos nas condições acima são apresentados na Tabela III.4, sendo que o desvio médio percentual entre as duplicatas foi menor do que 7 %.

**Tabela III.4** - Eficiências de extração das quinolonas no teste inicial de preparo de amostra.

Frações de Eluição	EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (%)*						
	NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
<b>Primeira</b>	65	62	53	55	54	60	47
<b>Segunda</b>	3	nd	1	nd	1	2	nd

\* n = 2, nd: não detectado.

Conforme os resultados apresentados na Tabela III.4, verificou-se que a maior quantidade dos analitos foram eluídos do cartucho SPE com a primeira fração (5 mL) do solvente de eluição. Portanto, não se justificaria empregar duas frações consecutivas de 5 mL para eluir os analitos.

No intuito de avaliar se a eficiência de extração poderia ser melhorada pelo emprego de uma solução de eluição de caráter básico em vez da solução ácida, foi empregada uma solução 20 % de NH<sub>4</sub>OH em ACN. As eficiências de extração para os analitos variaram de 49 a 69 %, conforme apresentado na Tabela III.5. O desvio médio percentual entre as duplicatas foi menor do que 9 %.

Embora não tenha se observado uma melhora significativa na eficiência de extração usando uma solução de eluição básica em relação a eluição ácida (Tabela III.4), esta foi escolhida para os estudos subseqüentes.

**Tabela III.5** - Eficiências de extração das quinolonas com eluição básica.

EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (%)*						
NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
69	66	60	56	54	61	49

\* n = 2.

Para avaliar a influência da força da solução extratora na eficiência de extração foram realizados dois testes. O primeiro foi delineado para avaliar se estava ocorrendo perda dos analitos durante a aplicação do extrato no cartucho SPE de fase reversa. Para tanto, procedeu-se a diminuição da força da solução extratora, pelo aumento da sua polaridade proporcionada pela diminuição da proporção de MeOH na sua composição (de 20 para 10 %). Os resultados são apresentados na Tabela III.6. O desvio médio percentual entre as duplicatas foi menor do que 6 %.

**Tabela III.6** - Eficiências de extração das quinolonas com o aumento da polaridade da solução extratora.

EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (%)*						
NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
61	57	50	57	49	58	42

\* n = 2.

Como podem ser observados pela comparação das Tabelas III.5 e III.6, os resultados indicam que a diminuição da força da solução extratora não resultou em melhoras nas eficiências de extração das quinolonas. Disto, o segundo teste foi realizado objetivando avaliar o efeito de um aumento na força da solução extratora, o que teoricamente poderia melhorar a extração dos analitos da matriz, mas em contrapartida, poderia aumentar a perda dos analitos durante o carregamento do cartucho SPE de fase reversa. Para essa avaliação, substituiu-

se o MeOH por ACN, na proporção de 20 % com a solução 10 % de ATCA, e os resultados são apresentados na Tabela III.7. O desvio médio percentual entre as duplicatas foi menor do que 8 %.

**Tabela III.7** - Eficiências de extração das quinolonas com a diminuição da polaridade da solução extratora.

EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (%)*						
NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
60	51	48	50	48	49	43

\* n = 2.

Comparando os resultados das Tabelas III.5 e III.7, não se verifica uma melhora dos resultados quando aumentada a força da solução extratora, de modo que sua composição para os testes subseqüentes ficou definida pela mistura de solução 10 % de ATCA com MeOH (8:2, v/v).

Também foi avaliada a influência da quantidade de amostra sobre a eficiência de extração. Para tanto, foram realizados estudos empregando 0,5, 1,0 e 2,0 g de carne de peixe. Os resultados revelaram que a eficiência de extração foi superior quando uma maior quantidade de amostra foi empregada no procedimento, conforme pode ser visualizado pelos resultados apresentados na Tabela III.8. O desvio médio percentual entre as duplicatas foi menor do que 8 %.

Dos resultados apresentados na Tabela III.8, a quantidade de 2,0 g de amostra foi selecionada para os estudos subseqüentes.

Após a otimização das condições de extração e limpeza dos extratos, diferentes cartuchos de extração em fase sólida (poliméricos e à base de sílica-C<sub>18</sub>) foram avaliados. Os resultados quanto à eficiência de extração são apresentados na Tabela III.9. O desvio médio percentual entre as duplicatas para o cartucho BOND-ELUT foi menor do que 8 % e para o HLB-OASIS e STRATA-X, menor do que 2 %.

**Tabela III.8** - Eficiências de extração das quinolonas em função da quantidade de amostra empregada.

Qtd. de Amostra	EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (%)*						
	NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
<b>0,5 g</b>	63	59	49	50	49	49	39
<b>1,0 g</b>	69	66	56	56	54	61	49
<b>2,0 g</b>	68	71	73	60	59	65	53

\* n = 2.

**Tabela III.9** - Eficiências de extração das quinolonas em função do cartucho SPE.

Cartuchos SPE	EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (%)*						
	NOR	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
<b>BOND-ELUT</b>	65	70	72	59	55	60	49
<b>HLB-OASIS</b>	75	74	70	66	63	72	59
<b>STRATA-X</b>	70	71	71	59	60	66	57

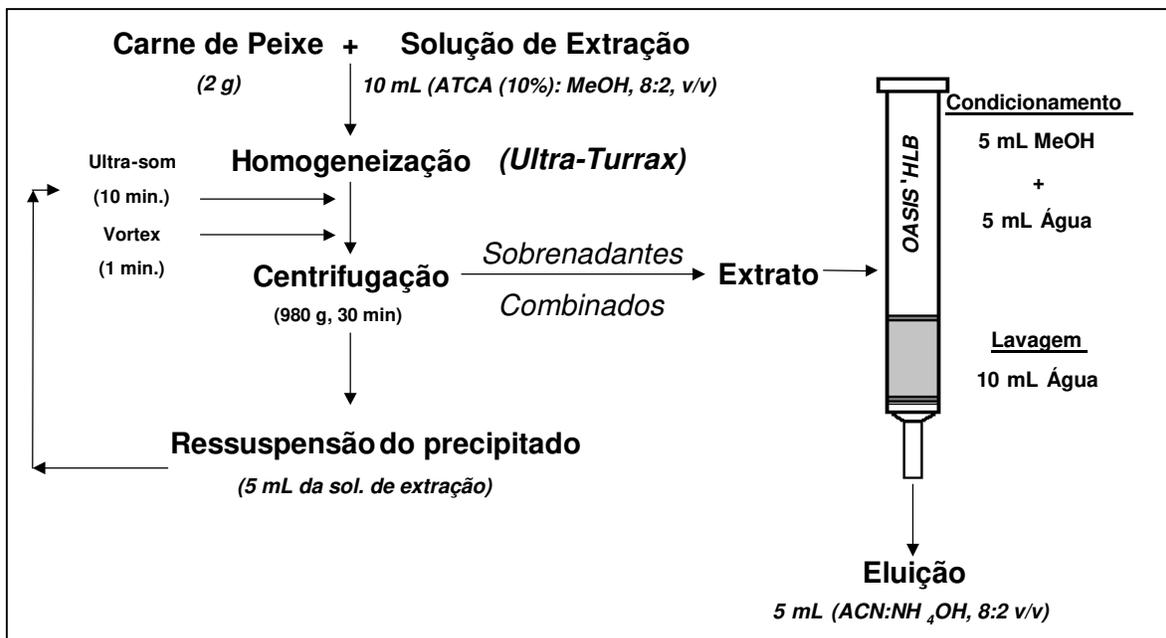
\* n = 2.

Os resultados obtidos indicaram uma superioridade quando do uso do STRATA-X e HLB-OASIS, proporcionando uma maior eficiência de extração, bem como um menor desvio médio percentual entre as duplicatas, quando comparados aos cartuchos à base de sílica (BOND-ELUT). Para os estudos subseqüentes foi selecionado o cartucho HLB-OASIS para compor o procedimento de preparo de amostras para extração de quinolonas de carne de peixe. É importante ressaltar também que cartuchos de fase polimérica apresentam uma maior regularidade na porosidade, o que pode contribuir com uma menor variabilidade entre cartuchos de lotes diferentes, quando comparados aos cartuchos à base de sílica. Esse fator é importante a ser considerado para análises de rotina.

Das condições testadas, as selecionadas para compor o procedimento de extração de quinolonas de carne de peixe foram: quantidade de amostra (carne de

peixe): 2,0 g; solução extratora: mistura de solução 10 % de ATCA com MeOH (8:2, v/v); cartucho de SPE: HLB-OASIS, 500 mg, 6 mL; solução de eluição das quinolonas dos cartuchos SPE: 5 mL da solução 20 % de  $\text{NH}_4\text{OH}$  em ACN.

A Figura III.7 apresenta de forma esquemática o procedimento definido para o preparo de amostra para extração das quinolonas de carne de peixe.



**Figura III.7** - Preparo da amostra de carne de peixe para extração das quinolonas.

### **III.5.1.3. Validação do método analítico**

Uma apresentação abordando a importância do procedimento de validação para um método analítico, as recomendações das diferentes agências reguladoras nacionais e internacionais, e um detalhamento das diferentes etapas envolvidas no processo, foi apresentada no item 1.8 (p.26).

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Conforme a classificação proposta pela IUPAC (THOMPSON *et al*, 2002), os procedimentos de validação podem ser divididos entre (1) validação

completa (*full validation*) e (2) validação do método em um único laboratório (*single-laboratory validation*). O procedimento envolvido no presente trabalho teve como foco a validação do método analítico para um laboratório. Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) usados para avaliar o método de separação desenvolvido no presente trabalho são: seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. As definições de cada um desses parâmetros estão detalhadas no item I.8 (p.26).

#### III.5.1.3.1. Seletividade

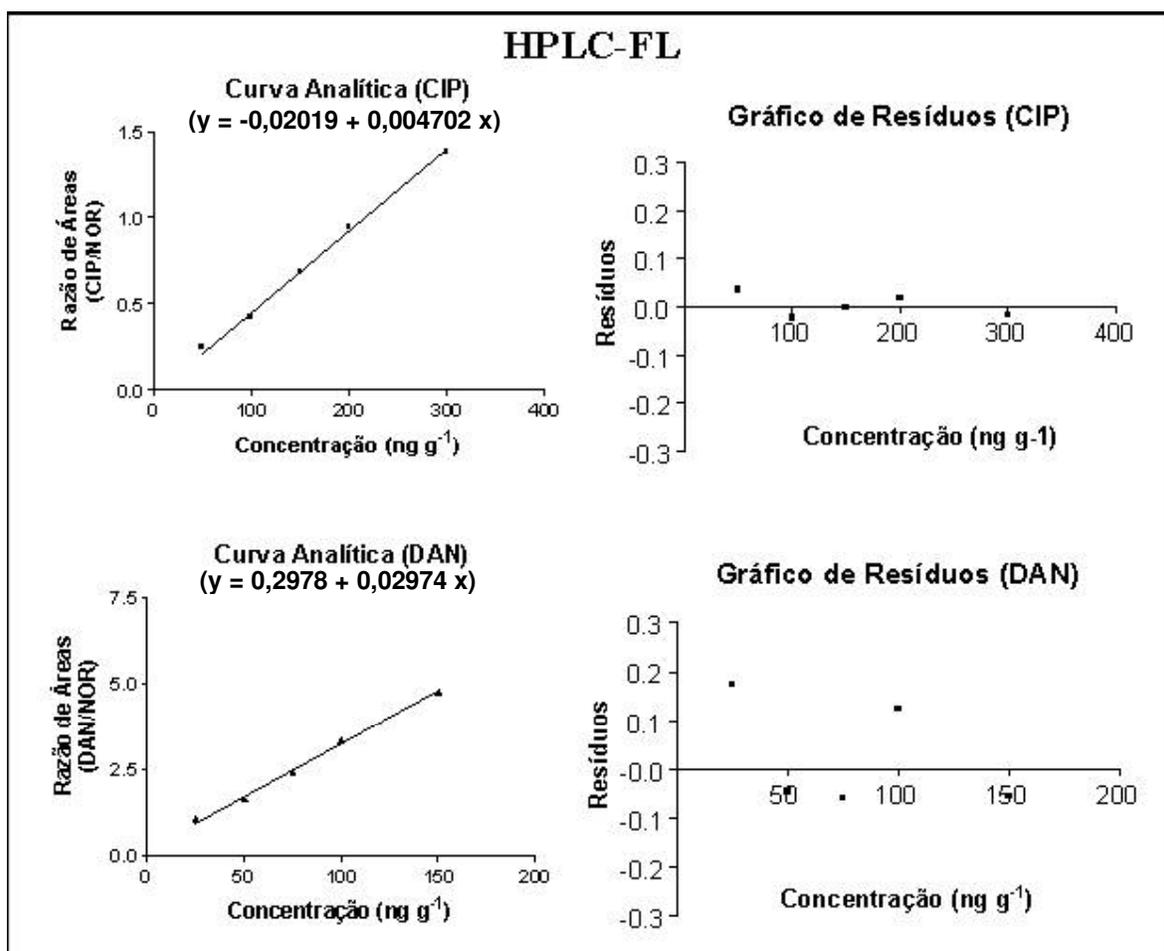
Esse parâmetro de validação já foi avaliado no presente estudo pela comparação dos cromatogramas obtidos para amostras branco de peixe e amostra branco fortificadas com as quinolonas, conforme Figuras III.5 e III.6 (p.61-62), através das quais pôde-se comprovar a seletividade do método desenvolvido.

#### III.5.1.3.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

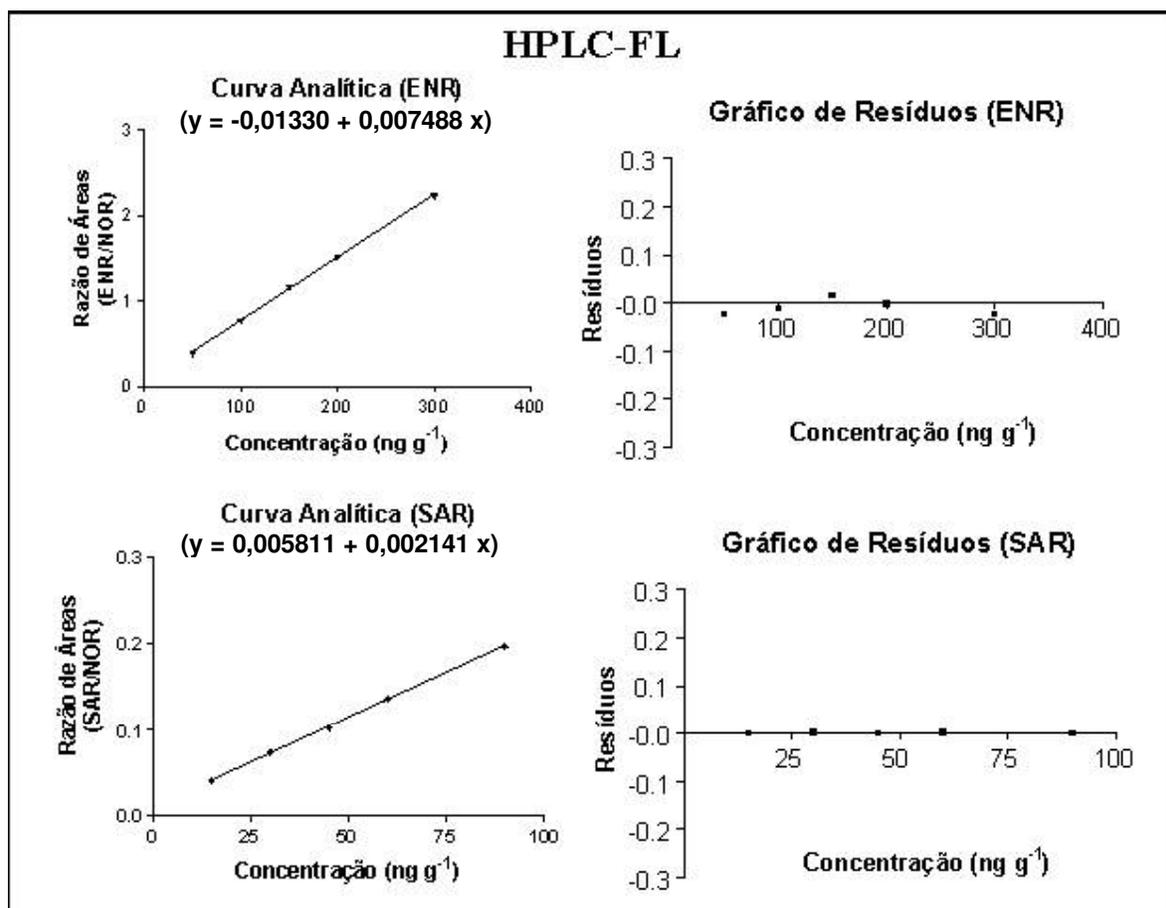
As curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de tilápias do grupo controle em cinco níveis de fortificação (P1, P2, P3, P4 e P5, Tabela III.2, p.50), e usando a NOR ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ) como padrão interno. As concentrações de cada uma das quinolonas para cada nível da curva analítica foram selecionadas de modo a conterem os respectivos LMR, conforme recomendações de EC (2002).

As sensibilidades do procedimento obtidas para cada uma das quinolonas estudadas foram expressas pelos coeficientes angulares das retas (inclinações) obtidas das regressões lineares das curvas analíticas (Tabela III.10, p.76).

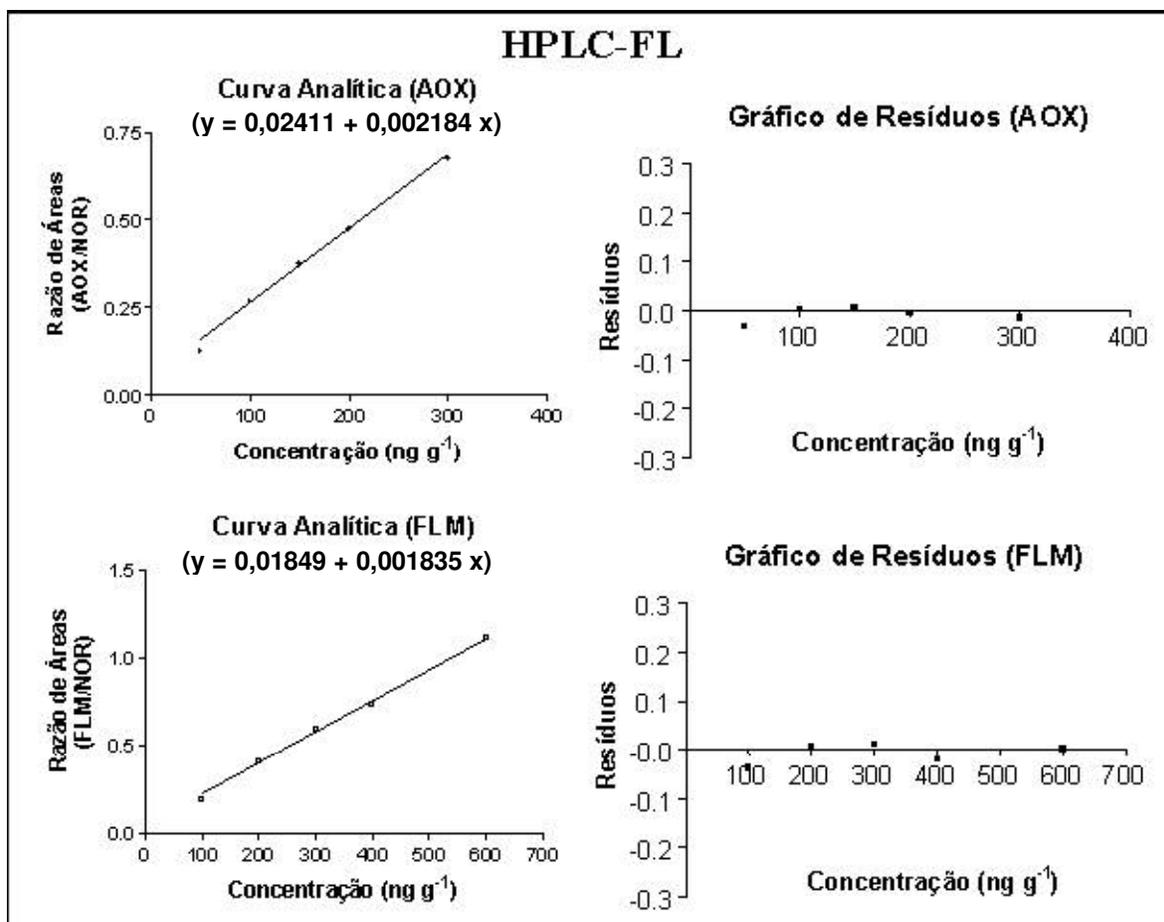
As curvas analíticas obtidas para cada uma das quinolonas estudadas, as respectivas equações lineares e os respectivos gráficos de resíduos estão apresentados nas Figuras III.8, III.9 e III.10.



**Figura III.8** - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para CIP e DAN obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.



**Figura III.9** - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para ENR e SAR obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.



**Figura III.10** - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para AOX e FLM obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por HPLC-FL.

A ANVISA preconiza que o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98, e a Comunidade Europeia 0,99 (EC 2002). O método desenvolvido apresentou linearidades para todos os analitos superiores a 0,99.

Considerando que as dispersões dos resíduos obtidos das curvas analíticas para cada uma das quinolonas pelo método desenvolvido estão dentro de uma variação menor do que 20 % (valor recomendado pela EC, 2002), fica comprovada a adequação do método para fins quantitativos, dentro das faixas de trabalho estabelecidas pelos cinco níveis de concentração das curvas analíticas (Tabela III.2, p.50).

#### III.5.1.3.3. Limite de Detecção (LOD)

Os limites de detecção (LOD) para cada uma das quinolonas foram determinados a partir da razão sinal/ruído igual a 3, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco de carne de peixe ( $n = 3$ ), tomando como referência as recomendações de ICH (1996). Os resultados obtidos, apresentados como valores médios das replicatas, foram: CIP ( $4 \text{ ng g}^{-1}$ ); DAN ( $2 \text{ ng g}^{-1}$ ); ENR ( $3 \text{ ng g}^{-1}$ ); SAR ( $8 \text{ ng g}^{-1}$ ); AOX ( $3 \text{ ng g}^{-1}$ ); e FLM ( $3 \text{ ng g}^{-1}$ ).

#### III.5.1.3.4. Limite de Quantificação (LOQ)

Os limites de quantificação (LOQ) para cada uma das quinolonas foram determinados a partir da razão sinal/ruído igual a 10, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco de carne de peixe ( $n = 3$ ), tomando como referência as recomendações de ICH (1996). Os resultados obtidos, apresentados como valores médios das replicatas, foram: CIP ( $15 \text{ ng g}^{-1}$ ); DAN ( $5 \text{ ng g}^{-1}$ ); ENR ( $13 \text{ ng g}^{-1}$ ); SAR ( $27 \text{ ng g}^{-1}$ ); AOX ( $10 \text{ ng g}^{-1}$ ); e FLM ( $11 \text{ ng g}^{-1}$ ).

É importante ressaltar que, para o método ser aceitável para as determinações em nível de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, os LOQ devem ser menores do que os LMR estabelecidos para os respectivos analitos em questão, o que veio a se confirmar, lembrando que os LMR em carne de peixe para as quinolonas estudadas são:  $30 \text{ ng g}^{-1}$  (SAR);  $100 \text{ ng g}^{-1}$  (AOX, DAN, CIP e ENR); e  $600 \text{ ng g}^{-1}$  (FLM).

#### III.5.1.3.5. Precisão

Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque proposto neste trabalho, duas etapas são relevantes para a obtenção da precisão: (i) precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante análises em um curto

espaço de tempo; e (ii) precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes condições (geralmente em dias diferentes).

Expressando a precisão em termos de coeficientes de variação (CV), a FDA e a ANVISA recomendam que os resultados não excedam 15 % de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20 % do CV). Já a IUPAC estabelece que os resultados obtidos não devem exceder 30 % do valor central.

Para avaliar a precisão do método desenvolvido, procedeu-se da seguinte forma:

A precisão intra-ensaios foi obtida para um nível de concentração (P3, Tabela III.2, p.50) de cada quinolona, mediante fortificação de amostras branco, analisadas em quintuplicatas ( $n = 5$ ), em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e os resultados obtidos, expressos como as estimativas dos desvios padrão relativos (RSD), são apresentados na Tabela III.10.

A precisão inter-ensaios foi obtida para três níveis de concentração (P2, P3 e P4, Tabela III.2, p.50) de cada analito, mediante fortificação de amostras branco, realizadas em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e os resultados obtidos, são apresentados na Tabela III.10.

Como pode ser visto na Tabela III.10, os resultados de precisão intra- e inter-ensaios para todas as quinolonas foram inferiores a 20 %, conforme recomendado pela EC (2002).

#### *III.5.1.3.6. Exatidão*

A exatidão do método desenvolvido no presente trabalho para cada uma das quinolonas estudadas foram avaliadas mediante testes de recuperação, com amostras branco de carne de tilápia fortificadas com os analitos em concentrações correspondentes ao terceiro nível de cada uma das curvas analíticas (P3, Tabela III.2, p.50), repetidas em três vezes ( $n = 3$ ). Os resultados obtidos, transformados

em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos após desenvolvimento do procedimento de extração, são apresentados na Tabela III.10.

**Tabela III.10** - Parâmetros de validação do método de determinação de quinolonas em carne de peixe por HPLC-FL.

Parâmetros de Validação (HPLC-FL)	QUINOLONAS					
	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
Faixa linear (ng g <sup>-1</sup> )	15-300	5-150	13-300	27-90	10-300	11-600
Linearidade	0,9947	0,9949	0,9996	0,9948	0,9991	0,9990
Sensibilidade (ua g ng <sup>-1</sup> )	0,00470	0,02970	0,00749	0,00214	0,00218	0,00184
Intra-Ensaio (RSD %)						
Nível P3 (n = 5)	3,3	3,4	3,5	3,5	2,6	1,5
Inter-Ensaio (RSD %)						
Precisão						
Nível P2 (n = 3)	10,9	3,3	7,6	9,6	4,9	6,2
Nível P3 (n = 3)	4,9	3,5	1,6	4,1	5,8	4,7
Nível P4 (n = 3)	1,4	3,3	0,8	5,6	4,4	4,0
LOD (ng g <sup>-1</sup> ) (n = 3)	4	2	3	8	3	3
LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) (n = 3)	15	5	13	27	10	11
Exatidão (% Recuperação, n = 3)	87-105	90-110	78-110	73-97	89-108	90-107

### **III.5.2. Método para a determinação de quinolonas em carne de peixe por LC-MS/MS**

#### **III.5.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico**

Em princípio, a técnica de espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foi introduzida no presente trabalho apenas com o objetivo de confirmação de identidade das quinolonas, complementando o método analítico desenvolvido para quantificação desses analitos por HPLC-FL.

A grande maioria dos métodos analíticos publicados, envolvendo LC-MS/MS na determinação de resíduos em alimentos, emprega o analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QQQ). No entanto, a habilidade do analisador de

massas do tipo tempo de voo (ToF) prover resultados de alta qualidade devido a medição de massas exatas dos analitos, o torna um instrumento de grande interesse para compor métodos confirmatórios de análise dentro do contexto legislativo, como o da Comunidade Européia (EC, 2002). Conforme essa regulação, métodos confirmatórios para resíduos orgânicos em alimentos devem prover informação da estrutura química dos analitos, e a detecção por MS é considerada como capaz de satisfazer tal exigência. O uso de técnicas MS com menor poder de resolução comparável ao ToF, como é o caso de QQQ, pode preencher os critérios de confirmação de resíduos baseado em sistemas estabelecidos de pontos de identificação, que estão relacionados às massas dos fragmentos de íons do(s) respectivo(s) analito(s) (BERGWERFF & SCHERPENISSE, 2003; HALME *et al*, 2004). Para esses tipos de técnicas de menor poder de resolução, um mínimo de três íons é requerido para a confirmação de substâncias de uso autorizado e quatro para compostos banidos (EC, 2002). Assim, o uso do sistema ToF pode atingir os pontos de identificação requeridos pela soma de apenas dois íons, o íon molecular protonado e um íon fragmento (HERNANDO *et al*, 2006). No entanto, instrumentos MS com analisadores do tipo QQQ apresentam uma reconhecida maior sensibilidade quando comparado ao ToF (STOLKER & BRINKMAN, 2005), e possivelmente essa seja a razão de serem preferidos para análises quantitativas de resíduos, conforme a grande maioria dos trabalhos da literatura.

O equipamento de MS empregado no presente estudo é composto por um sistema híbrido de analisadores de massas em série: o quadrupolo (Q) e o ToF.

É importante ressaltar que devido ao caráter seletivo e de alta resolução oferecido pela técnica de espectrometria de massas, em especial quando se envolve um analisador do tipo ToF, a qualidade da separação cromatográfica é menos crítica quando associada a esta técnica, do que quando o sistema cromatográfico está associado a detectores menos seletivos como os de absorvância (DAD) ou de FL. Desta forma, a avaliação dos parâmetros cromatográficos da separação das quinolonas pela técnica LC-MS/MS fez-se

desnecessária, já que a seletividade do método se comprovou adequada, conforme será discutido adiante.

#### III.5.2.1.1. Condições de detecção por MS

As condições iniciais selecionadas para os primeiros testes de ionização das quinolonas no espectrômetro de massas (Q-ToF) foram as recomendadas por Volmer *et al* (1997).

Depois de otimizadas, as condições finais estabelecidas para utilizar o sistema MS/MS para confirmação de identidade foram: vazão do gás no cone (50 L h<sup>-1</sup>); vazão do gás de dessolvatação (300 L h<sup>-1</sup>); polaridade positiva (ES+); voltagem no capilar (3500 V); voltagem no cone de amostragem (30 V); voltagem no cone de extração (2 V); temperatura de dessolvatação (250 °C); temperatura na fonte (150 °C); energia de ionização (1 V); energia de colisão (20 V); voltagem no detector do tipo placa de multi-canal (2500 V). Nessas condições foi possível obter uma quantidade satisfatória de íons produtos para identificação, além dos íons moleculares.

No entanto, no emprego de LC-MS/MS como método quantitativo das quinolonas, as condições de ionização tiveram uma variação na energia de colisão (de 20 para 5 V). Essa diminuição na energia de colisão foi importante para que houvesse uma maior porcentagem dos íons moleculares das quinolonas, melhorando, assim, a sensibilidade do método, lembrando que essa é considerada uma questão crítica para analisadores do tipo ToF (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

Para os estudos de ionização, as soluções contendo os analitos foram introduzidas no sistema MS/MS Q-ToF por infusão (sem prévia separação pelo sistema cromatográfico).

Os íons de quantificação e identificação produzidos nas condições de ionização selecionada são discriminados na Tabela III.11, bem como as respectivas razões m/z teóricas (m/z teor.) e as encontradas experimentalmente

(m/z exp.), além dos erros (expressos em ppm) entre essas razões m/z para cada íon.

Como pode ser visto na Tabela III.11, o método desenvolvido apresentou um erro de exatidão da razão m/z menor que 10 ppm para pelo menos dois dos íons de identificação produzidos para cada uma das quinolonas, garantindo a adequação do método para a confirmação da identidade dos analitos estudados. A característica de alta exatidão da razão m/z conferido à técnica aplicada na identificação das quinolonas, bem com a quantidade de íons de identificação, contribuem para a característica de alta seletividade do método, e garantem a adequação do método desenvolvido frente às recomendações da EC (2002).

**Tabela III.11** - Íons de quantificação e de identificação das quinolonas, e os respectivos erros de exatidão entre as razões m/z teóricas e experimentais.

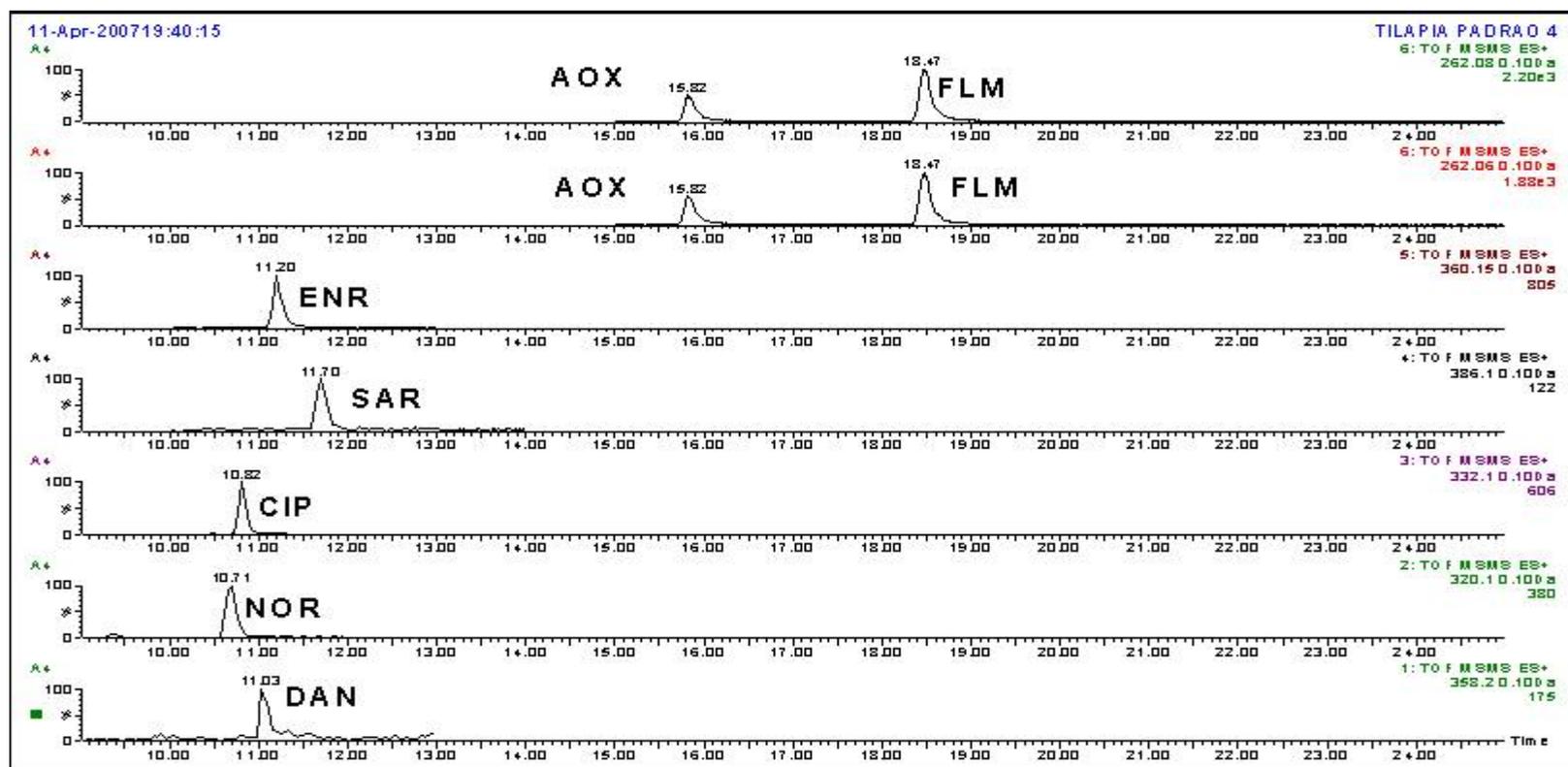
QUINOLONA	Íons de Identificação				
	Íon de Quantificação		m/z teor. (m/z exp.) (erro, ppm)	m/z teor. (m/z exp.) (erro, ppm)	m/z teor. (m/z exp.) (erro, ppm)
	Ion Molecular	m/z teor. (m/z exp.) (erro, ppm)			
DAN	$C_{19}H_{20}O_3N_3F_1$	358,1567 (358,1601) (-9,49)	340,1461 (340,1533) (-21,17)	314,1668 (314,1679) (-3,50)	283,0883 (283,1251) (-129,99)
CIP	$C_{17}H_{18}O_3N_3F_1$	332,1410 (332,1412) (-0,60)	314,1305 (314,1273) (10,19)	288,1512 (288,1491) (7,29)	245,1090 (245,1031) (24,07)
ENR	$C_{19}H_{22}O_3N_3F_1$	360,1723 (360,1724) (-0,28)	342,1618 (342,1639) (-6,14)	316,1825 (316,1810) (4,74)	245,1090 (245,1096) (-2,45)
SAR	$C_{20}H_{17}O_3N_3F_1$	386,1316 (386,1256) (15,54)	368,1211 (368,1243) (-8,69)	342,1418 (342,1410) (2,34)	299,0996 (299,0959) (12,37)
FLM	$C_{14}H_{12}O_3N_1F_1$	262,0880 (262,0875) (1,91)	244,0774 (244,0784) (-4,10)	202,0304 (202,0308) (-1,98)	
AOX	$C_{13}H_{11}O_5N_1$	262,0715 (262,0719) (-1,53)	244,0610 (244,0618) (-3,28)	216,0423 (216,0409) (6,48)	

### *III.5.2.1.2. Fases estacionária e móvel*

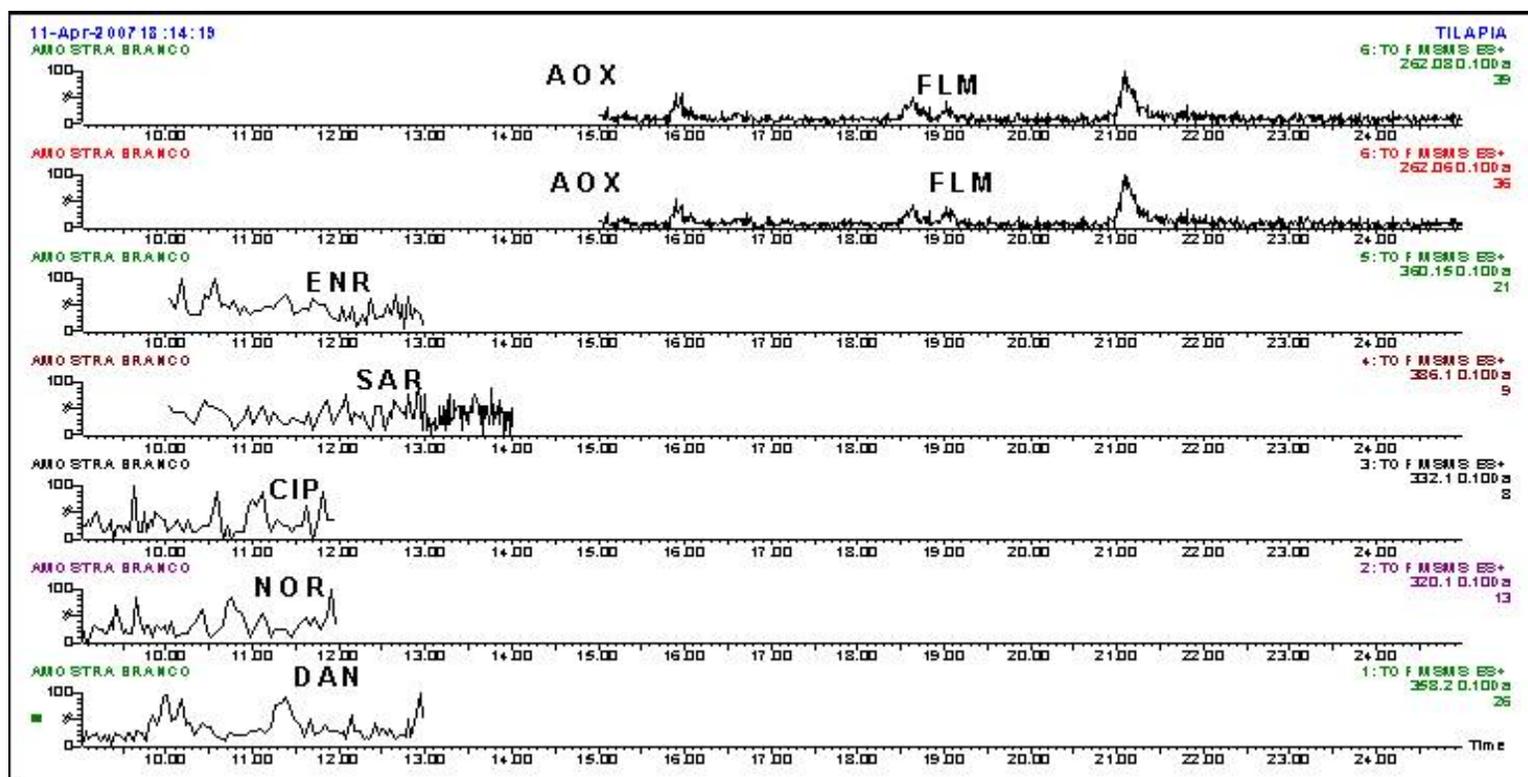
O procedimento para a determinação de quinolonas por LC-ESI-MS/MS Q-ToF foi desenvolvido a partir das condições cromatográficas estabelecidas para a determinação dessas mesmas substâncias por HPLC-FL (item III.5.1.1, p.55), uma vez que a fase estacionária empregada foi a mesma, com diferença apenas no comprimento e no diâmetro interno da coluna empregada (coluna analítica XTerra-B: 150 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m). A fase móvel precisou ser adaptada às exigências de volatilidade estabelecida pelo sistema MS, e foi então composta por uma mistura de 0,1 % de ácido acético em ACN (fase orgânica, FO) e 0,1 % de ácido acético em água v/v (fase aquosa, FA) sob eluição na vazão de 0,2 mL min<sup>-1</sup> por gradiente linear: de 0 a 15 min, variando de 100 % FA e 0 % de FO para 50 % de FA e 50 % de FO, mantendo-se assim até os 20 min da corrida cromatográfica, voltando à proporção inicial até 21 min e mantendo-se assim até os 25 min finais. Este procedimento analítico foi avaliado como um método confirmatório e também como um método quantitativo para a determinação de multi-resíduos das quinolonas em carne de peixe.

Um cromatograma característico de separação e detecção das quinolonas na matriz (carne de peixe) nas condições estabelecidas para o sistema LC-MS/MS Q-ToF é apresentado na Figura III.11 e, quando comparado ao cromatograma da Figura III.12, verifica-se a inexistência de interferentes da matriz que possam comprometer a quantificação e/ou identificação de qualquer uma das quinolonas analisadas.

Embora se verifique uma incompleta separação de algumas das quinolonas estudadas nas condições cromatográficas estabelecidas, como pode ser observado para NOR, CIP, DAN e ENR, a alta seletividade proporcionada pelo analisador ToF qualifica o método para finalidade pretendida, tanto para identificação dos analitos como para quantificação dos mesmos, como será apontados pelos dados de validação do método a serem apresentados adiante.



**Figura III.11** - Cromatograma característico de amostra branco de carne de peixe fortificada com as quinolonas nos níveis de concentração correspondentes ao nível P4. FE: XTerra-B, FM: FA (0,1 % ácido acético em água), FO (0,1 % ácido acético em ACN). Gradiente linear: de 0 a 15 min, variando de 100 % FA e 0 % de FO para 50 % de FA e 50 % de FO, e mantendo-se assim até os 20 min da corrida cromatográfica, voltando à proporção inicial até 21 min e mantendo-se assim até os 25 min finais. Vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Condições MS/MS: gás no cone (50 L h<sup>-1</sup>); gás de dessolvatação (300 L hr<sup>-1</sup>); polaridade (ES+); capilar (3500 V); cone de amostragem (30 V); cone de extração (2 V); dessolvatação (250 °C); fonte (150 °C); energia de ionização (1 V); energia de colisão (5 V); detector do tipo placa multi-canal (2500 V).



**Figura III.12** - Cromatograma característico de amostra branco de carne de peixe. FE: XTerra-B, FM: FA (0,1 % ácido acético em água), FO (0,1 % ácido acético em ACN). Gradiente linear: de 0 a 15 min, variando de 100 % FA e 0 % de FO para 50 % de FA e 50 % de FO, e mantendo-se assim até os 20 min da corrida cromatográfica, voltando à proporção inicial até 21 min e mantendo-se assim até os 25 min finais. Vazão:  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições MS/MS: gás no cone ( $50 \text{ L h}^{-1}$ ); gás de dessolvatação ( $300 \text{ L h}^{-1}$ ); polaridade (ES+); capilar (3500 V); cone de amostragem (30 V); cone de extração (2 V); dessolvatação ( $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ); fonte ( $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ); energia de ionização (1 V); energia de colisão (5 V); detector do tipo placa multi-canal (2500 V).

### **III.5.2.2. Preparo de amostra de carne de peixe**

Devido à reconhecida característica de alta seletividade oferecida pela técnica de espectrometria de massas (MS), uma das principais vantagens oferecidas em métodos analíticos que empregam esta técnica é a não exigência do envolvimento de um procedimento muito elaborado de preparo de amostra quando comparado a métodos envolvendo detecção por UV e/ou fluorescência. No entanto, essa vantagem não foi explorada no presente trabalho, de modo que o procedimento de extração das quinolonas de carne de peixe empregado para a determinação desses analitos por LC-MS/MS Q-ToF foi o mesmo descrito para a determinação por HPLC-FL (Figura III.7, p.69).

### **III.5.2.3. Validação do método analítico**

Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) usados para avaliar o método de separação desenvolvido para determinação das quinolonas por LC-MS/MS Q-ToF foram os mesmos utilizados para a técnica de HPLC-FL, que foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. O procedimento de obtenção desses parâmetros seguiu de forma idêntica ao já descrito para HPLC-FL. Porém, além desses parâmetros, foi também avaliado o efeito matriz, que será discutido mais detalhadamente.

#### **III.5.2.3.1. Seletividade**

Esse parâmetro de validação foi avaliado no presente estudo, pela análise de amostras branco de peixe e amostra branco fortificadas com as quinolonas em concentrações correspondentes aos níveis P3 das respectivas curvas analíticas (Tabela III.2, p.50), submetidas ao processo de extração descrito na Figura III.7 (p.69), e é observado da comparação das Figuras III.11 e III.12 (p.81-82), onde se pode comprovar a seletividade do método desenvolvido.

#### III.5.2.3.2. Efeito matriz

As agências reguladoras sugerem que quando a espectrometria de massas é empregada como sistema de detecção em associação com a cromatografia líquida, algumas considerações devem ser feitas em relação ao efeito matriz, uma vez que a matriz pode causar uma supressão da eficiência de ionização e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução na sensibilidade do método (ROGATSKY & STEIN, 2005). Segundo ROGATSKY & STEIN (2005) a extensão do efeito matriz na LC-MS/MS pode ser avaliada da seguinte forma:

Para a avaliação do efeito matriz no presente trabalho, amostras branco de carne de peixe foram submetidas ao processo de preparo de amostra, conforme descrito pela Figura III.7 (p.69). Após o procedimento de preparo, a etapa final de ressuspensão dos analitos após o processo de evaporação por fluxo de N<sub>2</sub> (~ 45 °C), foi feita em 1,0 mL de uma solução aquosa 0,010 mol L<sup>-1</sup> de ácido oxálico (pH 4,0), contendo as quinolonas nas concentrações correspondentes ao terceiro nível das respectivas curvas analíticas (Tabela III.2, p.50).

Os resultados obtidos para cada uma das quinolonas foram quantificados por curvas analíticas obtidas com os analitos em solução padrão, isto é, fora da matriz. As concentrações obtidas foram então convertidas em porcentagens das concentrações esperadas para cada uma das quinolonas, e a diferença desses valores para o 100 %, foi chamado de efeito matriz. Conforme pode ser observado na Tabela III.12, os valores de efeito matriz estiveram na faixa de 1,1 a 2,7 %, ou seja, não existe efeito matriz relevante uma vez que estes valores se situam dentro da própria precisão do método. O teste foi feito em duplicata, e o desvio médio obtido das mesmas para todas as quinolonas foi inferior a 2 %.

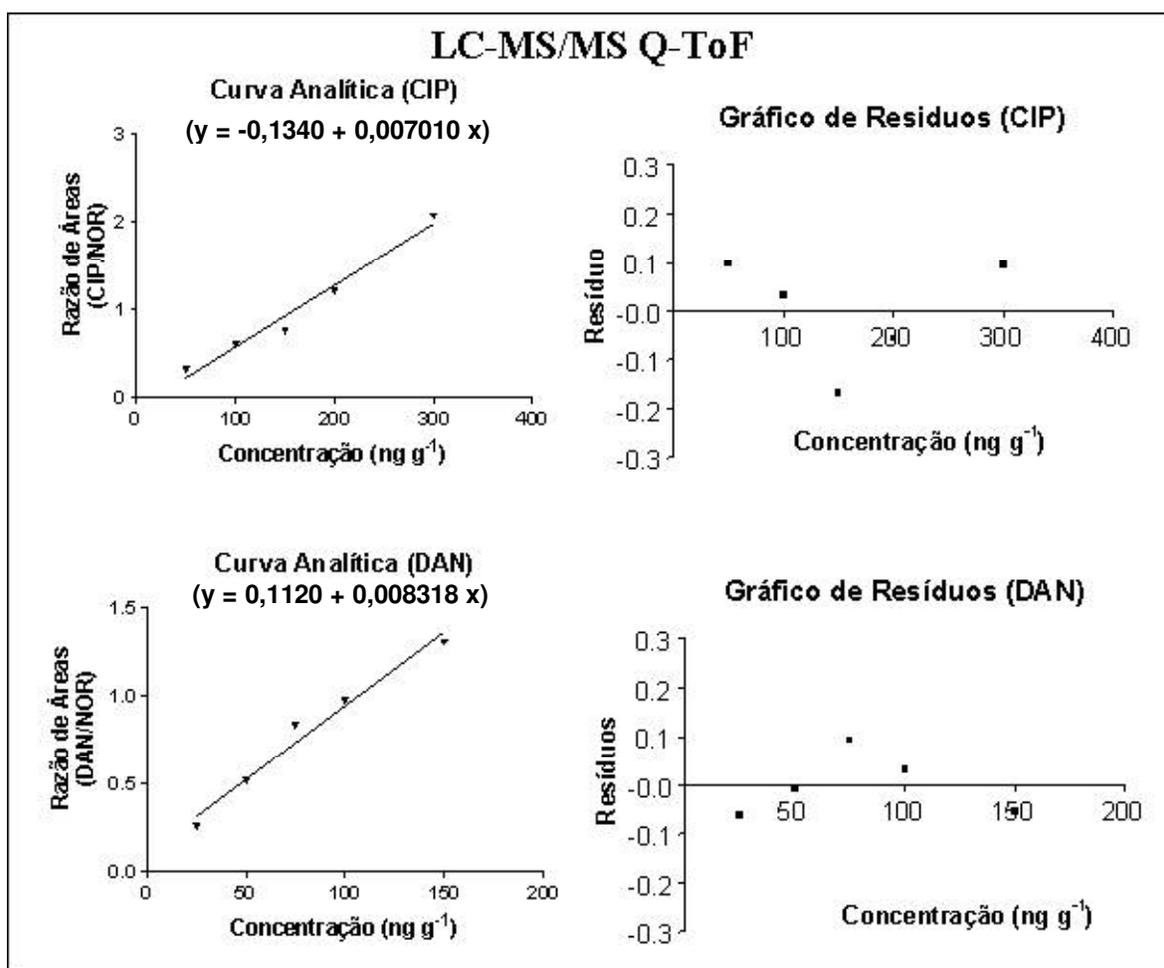
#### III.5.2.3.3. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

As curvas analíticas foram construídas mediante fortificação de amostras branco de tilápias do grupo controle em cinco níveis de fortificação (P1, P2, P3, P4 e P5, Tabela III.2, p.50), e usando a NOR (150 ng g<sup>-1</sup>) como padrão interno. As

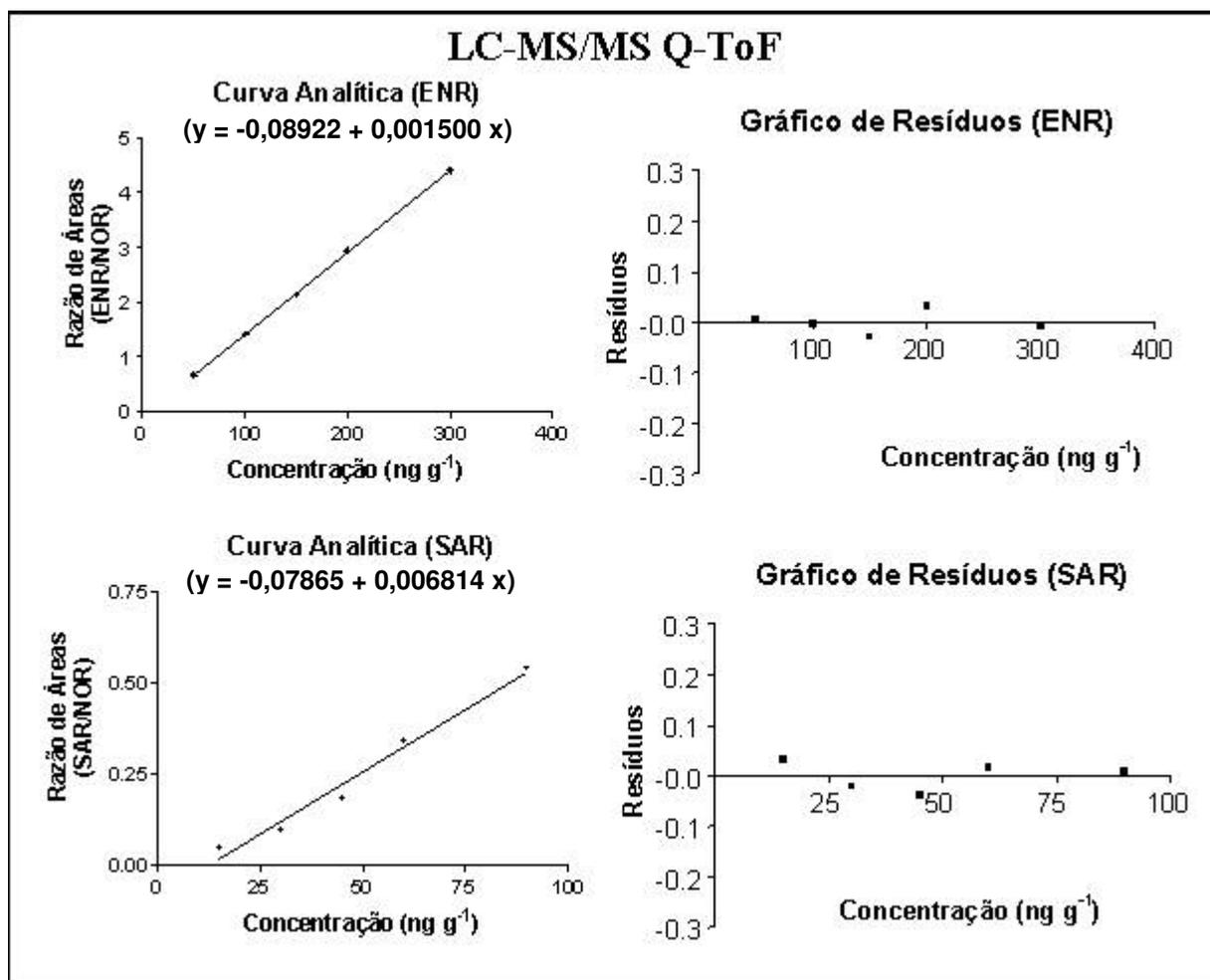
concentrações de cada uma das quinolonas para cada nível da curva analítica foram selecionadas de modo a conterem os respectivos LMR (Tabela I.1, p.11), conforme recomendações de EC (2002).

As sensibilidades do procedimento obtido para cada uma das quinolonas estudadas foram expressas pelos coeficientes angulares das retas (inclinações) obtidas das regressões lineares das respectivas curvas analíticas (Tabela III.12, p.90).

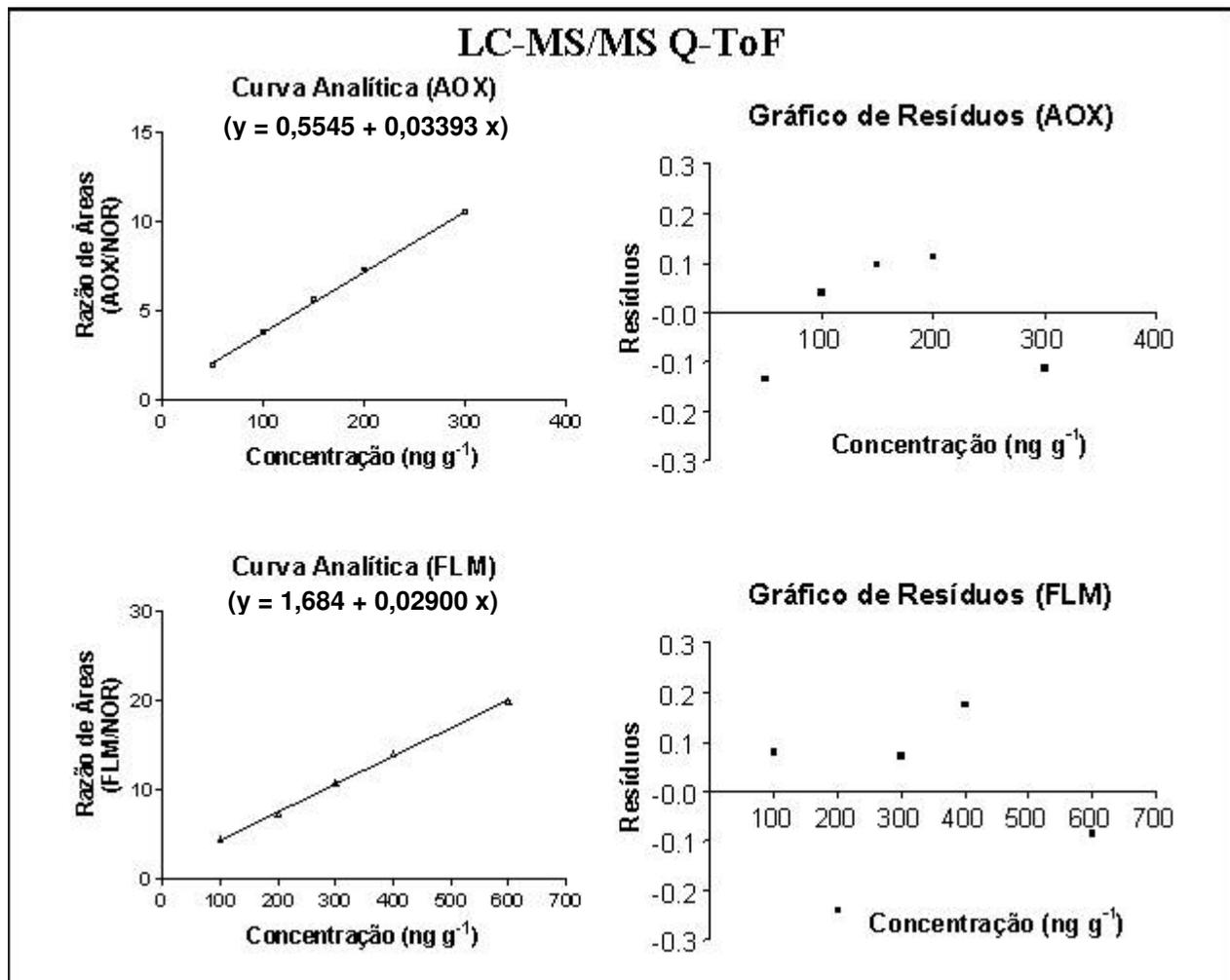
As curvas analíticas obtidas para cada uma das quinolonas estudadas, as respectivas equações lineares e os respectivos gráficos de resíduos estão apresentados nas Figuras III.13, III.14 e III.15.



**Figura III.13** - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para CIP e DAN obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por LC-MS/MS.



**Figura III.14** - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para ENR e SAR obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por LC-MS/MS.



**Figura III.15** - Curvas analíticas e gráficos de resíduos para AOX e FLM obtidos para o método desenvolvido para quantificação de quinolonas por LC-MS/MS.

O método desenvolvido para a quantificação das quinolonas em carne de peixe apresentou linearidades superiores a 0,99.

Considerando a linearidade e a dispersão dos resíduos dentro de uma variação menor do que 20 % (valor recomendado pela EC, 2002), fica comprovada a adequação do método para fins quantitativos, dentro das faixas de trabalho estabelecidas pelos cinco níveis de concentração das curvas analíticas (Tabela III.2, p.50).

#### III.5.2.3.4. Limite de Detecção (LOD)

Existem diferentes procedimentos para se estimar o LOD, entre esses o estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual a 3, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco (ICH, 1996), o qual foi empregado no presente trabalho, em triplicatas ( $n = 3$ ), onde se teve os seguintes resultados, apresentados como valores médios das repetições: CIP ( $4 \text{ ng g}^{-1}$ ); DAN ( $4 \text{ ng g}^{-1}$ ); ENR ( $6 \text{ ng g}^{-1}$ ); SAR ( $4 \text{ ng g}^{-1}$ ); AOX ( $5 \text{ ng g}^{-1}$ ); FLM ( $5 \text{ ng g}^{-1}$ ).

#### III.5.2.3.5. Limite de Quantificação (LOQ)

Existem diferentes procedimentos para se estimar o LOQ, entre esses o estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual a 10, nos tempos de retenção das mesmas, em amostras branco (ICH, 1996), o qual foi empregado no presente trabalho, em triplicatas ( $n = 3$ ), onde se teve os seguintes resultados, apresentados como valores médios das replicatas: CIP ( $17 \text{ ng g}^{-1}$ ); DAN ( $15 \text{ ng g}^{-1}$ ); ENR ( $21 \text{ ng g}^{-1}$ ); SAR ( $14 \text{ ng g}^{-1}$ ); AOX ( $16 \text{ ng g}^{-1}$ ); FLM ( $18 \text{ ng g}^{-1}$ ).

É importante ressaltar que para que o método seja aceitável para as determinações de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, os LOQ devem ser menores do que os LMR estabelecidos para os respectivos analitos em questão, o que veio a se confirmar, lembrando que os LMR em carne de peixe para as quinolonas estudadas são:  $30 \text{ ng g}^{-1}$  para SAR;  $100 \text{ ng g}^{-1}$  para AOX, DAN, CIP e ENR; e  $600 \text{ ng g}^{-1}$  para FLM.

#### III.5.2.3.6. Precisão

Para avaliar a precisão do método desenvolvido, o procedimento ocorreu da seguinte forma:

Precisões inter-ensaio: foram obtidas para três níveis de concentração (P2, P3 e P4, Tabela III.2, p.50), mediante fortificação de amostras branco, em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no

mesmo equipamento e os resultados, expressos como as estimativas dos desvios padrão relativo (RSD), são apresentados na Tabela III.12.

Precisões intra-ensaio: foram obtidas para um nível de concentração (P3, Tabela III.2, p.50), mediante fortificação de amostras branco, analisadas em quintuplicata (n= 5) em um mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento e os resultados, expressos como as estimativas dos desvios padrão relativo (RSD) são apresentados na Tabela III.12.

Como pode ser visto na Tabela III.12, as precisões intra e inter-ensaios para todas as quinolonas foram inferiores a 20 %, conforme recomendado pela EC (2002).

#### *III.5.2.3.7. Exatidão*

A exatidão do método desenvolvido, obtida para cada uma das quinolonas estudadas, foram avaliadas mediante testes de recuperação, com amostras branco de carne de tilápia fortificadas com os analitos em concentrações correspondentes aos terceiros níveis das respectivas curvas analíticas (Tabela III.2, p.50), repetidas três vezes (n = 3). Os resultados obtidos, transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos, após desenvolvimento do procedimento de extração, são apresentados na Tabela III.12.

A Tabela III.12 sumariza os resultados obtidos dos parâmetros de validação para o método desenvolvido para determinação das quinolonas em carne de peixe.

**Tabela III.12** - Parâmetros de validação do método de determinação de quinolonas em carne de peixe por LC-MS/MS Q-ToF.

Parâmetros de Validação (LC-MS/MS Q-ToF)	QUINOLONAS					
	CIP	DAN	ENR	SAR	AOX	FLM
Faixa linear (ng g <sup>-1</sup> )	17-300	15-150	21-300	14-90	16-300	18-600
Linearidade	0,9862	0,9874	0,9999	0,9948	0,9956	0,9905
Sensibilidade (ua g ng <sup>-1</sup> )	0,00701	0,00832	0,01500	0,00681	0,03393	0,29000
Intra-Ensaio (RSD %)						
<i>Nível P3 (n = 5)</i>	4,3	7,7	7,0	12,7	6,7	6,1
Precisão Inter-Ensaio (RSD %)						
<i>Nível P2 (n = 3)</i>	1,6	15,7	10,1	19,7	11,2	8,8
<i>Nível P3 (n = 3)</i>	6,3	18,3	7,6	13,6	7,6	11,8
<i>Nível P4 (n = 3)</i>	4,0	9,7	7,9	20,0	13,0	6,1
LOD (ng g <sup>-1</sup> , n=3)	4	4	6	4	5	5
LOQ (ng g <sup>-1</sup> , n=3)	17	15	21	14	16	18
Efeito Matriz (RSD %, n = 3)	2,7	1,1	1,9	2,5	1,2	1,2
Exatidão (RSD %, n=3)	90-92	89-95	94-112	89-107	91-108	90-111

Todos os parâmetros de validação são adequados para o uso de LC-MS/MS Q-ToF às propostas de determinação de quinolonas em carne de peixe.

### III.6. Conclusões

O procedimento de preparo de amostra de carne de peixe visando a extração de quinolonas apresentou resultados satisfatórios de eficiências de extração, variando na faixa de 59 a 75 %, e adequadas faixas de recuperação quando do envolvimento de ambas as técnicas analíticas empregadas.

Os resultados de validação obtidos para os métodos cromatográficos desenvolvidos com os sistemas HPLC-FL e LC-MS/MS Q-ToF para a quantificação de resíduos de ácido oxolínico, flumequina, sarafloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacina e danofloxacina os qualificam para os propósitos de inspeção da presença dessas substâncias em carne de tilápias, considerando que

os LOQ obtidos ficaram abaixo dos LMR das respectivas quinolonas estudadas, conforme recomendações das principais agências reguladoras de procedimentos de validação de métodos analíticos.

A técnica MS/MS Q-ToF apresentou comprovada seletividade para todas as quinolonas, suprimindo as exigências sugeridas em EC (2002) para a confirmação das identidades das mesmas.

Fazendo uma comparação dos métodos desenvolvidos para ambas as técnicas cromatográficas empregadas, pode-se verificar que os resultados de validação para HPLC-FL revelaram melhores valores de precisão (intra- e interensaios), e melhores LOQ para a grande maioria das quinolonas estudadas, a exceção da SAR, para a qual pôde-se obter um LOQ menor empregando LC-MS/MS Q-ToF.

Devido ao caráter de alta seletividade oferecida por técnicas de espectrometria de massas, principalmente aquelas compostas por analisadores de massas do tipo ToF, como foi o caso do experimento, um procedimento menos elaborado de preparo de amostra poderia valorizar esta técnica em relação à outra empregada (HPLC-FL). No entanto, isso não foi feito neste trabalho.

O detector de fluorescência tem a reconhecida desvantagem de ser menos seletivo que a técnica de espectrometria de massas, no entanto, esse parâmetro foi avaliado e se mostrou adequado às propostas quantitativas.

De um modo geral, pode-se afirmar que ambas as técnicas permitiram o desenvolvimento de métodos adequados às respectivas propostas.

---

---

# **CAPÍTULO IV**

*AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO DE OXITETRACICLINA  
EM CARNE DE TILÁPIAS  
APÓS MEDICAÇÃO VIA RAÇÃO*

---

---

## IV.1. Introdução

Desde sua descoberta em meados de 1900, os antimicrobianos pertencentes ao grupo das tetraciclinas desempenham importante função na medicina veterinária. Seu uso terapêutico tem sido de especial interesse em animais destinados a produção de alimentos devido à amplitude que oferece em relação ao espectro de ação e ao baixo custo. A oxitetraciclina (OTC) é um representante desse grupo de antimicrobianos significativamente empregados na aquicultura (AUSTIN, 1984). Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos em todo o mundo com o objetivo de estudar o emprego e a consequência do uso de OTC em peixes (KERRY *et al*, 1995; NAMDARI *et al*, 1996; BROWN *et al*, 2002; RIGOS *et al*, 2006), enfatizando a importância deste antimicrobiano na aquicultura.

O Brasil apresenta uma carência de informações no que diz respeito à legislação e ao uso de antimicrobianos destinados à aquicultura, de modo que o desenvolvimento de estudos envolvendo o uso dessas substâncias em espécies aquícolas de cultivo nacional, nas condições climáticas tropicais características, podem fornecer resultados importantes a contribuir tanto com a divulgação dessa questão, como com o fornecimento de dados com embasamento científico.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR, instituído pela Portaria Ministerial nº 527 (15/08/1995), mesmo depois de uma atualização das atividades pela Portaria Ministerial nº 50 (20/02/2006) e nº 9 (30/03/2007), ainda não inclui a determinação de resíduos de tetraciclinas em pescado.

Estudos de depleção de OTC em carne de peixes (MEINERTZ *et al*, 2001; BERNARDY *et al*, 2003; CHEN *et al*, 2004) já foram feitos principalmente em condições de clima temperado, envolvendo espécies características para esse ambiente como, por exemplo, o salmão.

## IV.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi o de promover um ensaio com peixes para a avaliação da depleção em função do tempo de resíduos de oxitetraciclina (OTC) na carne de tilápias medicadas com este antimicrobiano via ração. Para tanto, etapas preliminares precisaram ser estabelecidas como o desenvolvimento e a validação de métodos para a determinação de OTC na ração e em carne de tilápias, usando a cromatografia líquida de alta eficiência.

## IV.3. Parte experimental

### IV.3.1. Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, composto por um sistema de bombardeamento binário, modelo 1525 (Waters, EUA); injetor modelo 7725 (Rheodyne, EUA), com amostrador de 50  $\mu$ L; detector de arranjo de fotodiodos (DAD), modelo 2996 (Waters, EUA) em série com um detector de fluorescência multi-canal, modelo 2475 (Waters, EUA). A aquisição de dados foi realizada mediante programa computacional Millenium<sup>32</sup> versão 4.0 e microcomputador Pentium III, 900 MHz, HD 20 G com impressora HP 640C (Hewlett Packard, EUA).

No preparo de soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli-Q, modelo Academic (Millipore, EUA).

Para a degaseificação da fase móvel e o preparo de amostras foi empregado um banho de ultra-som modelo USC 700 (Unique Thorton, Brasil).

O pH das soluções foi ajustado com um pH-metro modelo OP-271 (Digimed DM-20, Brasil), empregando um eletrodo de vidro combinado.

No preparo de amostras foram utilizados: um homogeneizador Ultra-Turrax, modelo T18 basic (IKA, Brasil), uma centrífuga Excelsius II (Fanem, Brasil) e um sistema a vácuo para extração em fase sólida com capacidade para 12 cartuchos (Alltech, EUA).

### **IV.3.2. Coluna cromatográfica**

Coluna analítica de fase reversa de composição de sílica híbrida XTerra-A, C<sub>18</sub>, 250 x 4,6 mm, 5 μm (Waters, EUA) e coluna de guarda XTerra C<sub>18</sub>, 20 x 3,9 mm, 5 μm (Waters, EUA).

### **IV.3.3. Cartuchos de extração em fase sólida**

No preparo das amostras de carne de peixe foram empregados cartuchos de extração em fase reversa polimérica HLB-OASIS, 500 mg, 6 mL (Waters, EUA).

### **IV.3.4. Solventes e reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Foram utilizados NaOH, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, EDTA sódico (Titriplex®), fosfato monossódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) e ácido acético da Merck (Alemanha), ácido tricloroacético (ATCA) da Sigma (EUA). ACN e MeOH foram solventes de grau cromatográfico (Tedia, Brasil).

### **IV.3.5. Preparo de soluções**

#### **IV.3.5.1. Soluções estoques**

A partir dos padrões comerciais de cloridrato de oxitetraciclina (99,8 %) e tetraciclina (92,6 %), ambas adquiridas da ICN Biomedical Inc. (EUA), e norfloxacin (99,9 %) adquirida da Kyorin Pharmac. (Japão), foram preparadas soluções estoques individuais na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> em MeOH, em volumes finais de 50 mL.

Para o preparo da solução estoque de NOR, a 50 mg do padrão comercial foi adicionado 0,5 mL de ácido acético glacial, e o volume foi completado com

MeOH. Para o preparo das soluções estoques de OTC e TC foram feitos simples dissoluções dos padrões comerciais em MeOH.

Conforme recomendações na literatura, as soluções estoques das tetraciclina foram armazenadas em frascos âmbar, mantidas em freezer (- 18 °C), e foram utilizadas por um período de até 1 mês (BLANCHFLOWER *et al*, 1997; YANG *et al*, 2005). A solução estoque de NOR foi armazenada da mesma forma procedida para as tetraciclina, porém por um período de até 3 meses (ROUDAUT & YORKE, 2002; TOUSSAINT *et al*, 2005).

#### **IV.3.5.2. Soluções de trabalho**

As soluções de trabalho dos antimicrobianos na concentração de 20 µg mL<sup>-1</sup> e abaixo desta foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções estoque com uma solução contendo acetato de sódio (0,0375 mol L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,0175 mol L<sup>-1</sup>) e EDTA (0,0125 mol L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para 7,0.

#### ***IV.3.6. Planejamento do ensaio para estudo de depleção de OTC na carne de tilápias***

##### **IV.3.6.1. Medicamento**

Levando em consideração que não há antimicrobiano legislado para peixe no Brasil, a formulação comercial utilizada foi a Terramicina<sup>®</sup> em pó solúvel com Antigerm 77 (Pfizer Ltda., Guarulhos-SP). Este produto apresenta prescrição para frangos e galinhas, bovinos, caprinos, ovinos, suínos, coelhos e abelhas. É formulado como pó solúvel, com recomendação para adição na água de consumo dos animais.

Com relação à dose do medicamento a ser fornecida aos peixes, tomou-se como referência dados da FDA (1996) que aprova a dose de tratamento de 55,1 a

82,7 mg OTC HCl por kg de peso vivo por dia, estabelecendo a dose diária de 80 mg (kgPV)<sup>-1</sup> a ser empregada no tratamento do ensaio com as tilápias.

O período de tratamento selecionado foi o de 5 dias consecutivos, baseado em recomendações de medicamento aprovado para uso nos EUA (Oxytetracycline 20 % TSA<sup>®</sup>, Shering-Plough, EUA), que também é o mesmo período recomendado discriminado pelo medicamento Terramicina<sup>®</sup> aos animais a que se aplica.

A composição do medicamento comercial Terramicina em pó solúvel com Antigerm 77 (Pfizer Ltda., Guarulhos-SP) é discriminada na Tabela IV.1.

**Tabela IV.1** - Composição do produto comercial Terramicina em pó solúvel com Antigerm 77 (Pfizer Ltda.).

<b>Componente</b>	<b>Para cada 100 g de medicamento</b>
Cloridrato de Oxitetraciclina (OTC)	5,5 g
Cloreto Benzetônico	5,5 g

#### **IV.3.6.2. Ração**

Para os diferentes estágios de desenvolvimento dos peixes até a fase adulta, foram utilizados três tipos diferentes de ração, todas adquiridas do mesmo fabricante (Nutripeixe, Purina<sup>®</sup>). Durante a fase de alevinos, até atingirem um peso médio individual de 10 g, os peixes receberam a ração Nutripeixe AL55, que contém um alto teor de proteína. Na fase seguinte, a ração fornecida foi a Nutripeixe AL45, que foi fornecida até que os animais atingissem um peso médio individual de 70 g. Na fase final, os peixes passaram a receber a ração Nutripeixe Crescimento, que foi fornecida até a conclusão do ensaio com esses animais.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia: pela manhã (8-9 h) e à tarde (16-17 h).

A composição das rações comerciais utilizadas no ensaio com as tilápias está discriminada na Tabela IV.2.

O peso médio dos peixes foi tirado por amostragem de 20 animais, a cada 3 meses. A seleção da ração a ser fornecida conforme a faixa de peso dos peixes foi feita conforme recomendações do fabricante.

**Tabela IV.2** - Composição das rações comerciais utilizadas no ensaio com as tilápias.

<b>RAÇÕES NUTRIPEIXE (PURINA®)</b>			
<b>Composição</b>	<b>AL 55</b>	<b>AL45</b>	<b>Crescimento</b>
<b>Umidade (máximo)</b>	13,0 %	13,0 %	13,0 %
<b>Proteína Bruta (mínimo)</b>	55,0 %	45,0 %	28,0 %
<b>Extrato Etéreo (mínimo)</b>	10,0 %	8,0 %	4,0 %
<b>Fibra (máximo)</b>	5,0 %	7,0 %	10,0 %
<b>Cinzas (máximo)</b>	14,0 %	14,0 %	14,0 %
<b>Cálcio (máximo)</b>	2,0 %	2,5 %	3,0 %
<b>Fósforo (mínimo)</b>	1,0 %	0,6 %	0,6 %
<b>Enriquecimento Mineral</b>			
<b>Magnésio (mg)</b>	700	700	700
<b>Ferro (mg)</b>	100	100	100
<b>Cobre (mg)</b>	15	15	15
<b>Zinco (mg)</b>	200	200	200
<b>Manganês (mg)</b>	30	30	30
<b>Iodo (mg)</b>	1,0	1,0	1,0
<b>Selênio (mg)</b>	0,3	0,3	0,3
<b>Enriquecimento Vitamínico</b>			
<b>Vitamina A (UI)</b>	12000	12000	9000
<b>Vitamina D3 (UI)</b>	4000	4000	3000
<b>Vitamina E (UI)</b>	150	150	112
<b>Vitamina K (UI)</b>	10	10	7,5
<b>Ácido Fólico (mg)</b>	10	10	7,5
<b>Biotina (mg)</b>	0,8	0,8	0,6
<b>Colina (mg)</b>	2000	500	500
<b>Niacina (mg)</b>	150	150	112
<b>Pantotenato de Cálcio (mg)</b>	50	50	37
<b>Tiamina (mg)</b>	30	30	22
<b>Riboflavina (mg)</b>	30	30	22
<b>Piridoxina (mg)</b>	30	30	22
<b>Vitamina B12 (mcg)</b>	35	35	26
<b>Vitamina C (mg)</b>	300	300	150

### **IV.3.6.3. Preparo da ração adicionada de OTC**

A forma de fornecimento da medicação aos peixes selecionada foi via oral através da ração.

A execução do ensaio com o fornecimento de medicação à base de oxitetraciclina ocorreu quando os animais eram alimentados com a ração comercial Nutripeixe Crescimento (Purina®) e, portanto, essa foi a ração utilizada para a adição do medicamento a ser empregado no estudo.

Uma quantidade de 3 kg da ração comercial foi pulverizada com o auxílio de um moedor de carnes adaptado, e recebeu adição de 180 g do produto comercial Terramicina, equivalendo a uma quantidade de 9,9 g de OTC (5,5 %, m/m). Depois da adição do medicamento, a mistura foi homogeneizada. A mistura foi novamente transformada em péletes após o umedecimento da mesma com água destilada, seguindo um reprocessamento no moedor de carnes adaptado. Em seguida, os péletes foram secos em estufa (~ 35 °C), por um período de 48 horas.

Conforme será discutido no item IV.3.6.4 (p.102), para o ensaio foram selecionados 100 peixes, com um peso médio em torno de 100 g. Desta forma, a ração medicada para todo o ensaio foi preparada considerando um peso vivo total de 10 kg, com um fornecimento diário de ração adicionada de OTC correspondente a 3 % do peso vivo, por um período de tratamento de 5 dias consecutivos. Portanto, para todo o tratamento com o antimicrobiano seria necessária uma quantidade total de 1,5 kg de ração medicada. A dosagem diária selecionada para a medicação dos peixes foi de 80 mg de OTC por kg de peso vivo. Como o medicamento comercial contém 5,5 % (m/m) desse princípio ativo, seria necessária a adição de 73 g de Terramicina® à ração comercial para uma quantidade final de 1,5 kg de ração medicada. Para não correr o risco de precisar haver um novo preparo de ração medicada, optou-se por preparar uma quantidade total de 3 kg dessa ração, a qual deveria então conter 146 g de Terramicina®. Com o intuito de se prevenir contra possíveis perdas do princípio ativo durante o processamento de incorporação do medicamento na ração, optou-se por aumentar

a concentração de OTC por g de ração preparada, adicionando assim 180 g de Terramicina® para compor a quantidade total de 3 kg da ração medicada. Para a garantia do controle da dosagem do medicamento fornecido aos peixes, após o preparo da ração, antecedendo a etapa de medicação, a concentração de OTC foi determinada por HPLC-DAD, conforme será descrito no item IV.4.1.1 (p.110). No caso de o resultado confirmar uma concentração de OTC na ração superior à necessária, a mesma seria diluída com a ração comercial que também foi submetida ao mesmo processamento de moagem e peletização, porém sem a adição do medicamento.

#### **IV.3.6.4. Ensaio com as tilápias**

A espécie de peixe empregada no ensaio foi a tilápia (tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*). Uma quantidade de 1000 alevinos foi adquirida da Empresa AQUABEL (Fazenda Belmonte, Rolândia-PR), com 7 dias de vida, em setembro de 2006. Esses alevinos foram mantidos e desenvolvidos no Departamento de Zootecnia de Não Ruminantes, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/SUP), sob supervisão do Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino. Desde o recebimento dos alevinos, os mesmos foram comportados em um tanque (Figura IV.1) com 16 m<sup>3</sup> de capacidade, abastecido por um sistema de recirculação de água contínuo, com aeração constante através de um difusor de ar, até que atingissem um peso médio ao redor de 50 g, quando então se procedeu a transferência de cerca de 600 indivíduos desse grupo para um outro tanque semelhante, aumentando o espaço disponível para os cerca de 400 peixes restantes permitindo um melhor desenvolvimento destes.



**Figura IV.1** - Tanque de cultivo das tilápias.

Quanto ao número de peixes a serem utilizados no ensaio, a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) apresenta uma norma de procedimento (OECD, 1996) para avaliação da bioconcentração de substâncias químicas em peixes na qual recomenda um número mínimo de 4 indivíduos por tratamento (diferentes concentrações testes da substância avaliada). A agência norte-americana FDA (2006) recomenda o uso de 5 indivíduos por tratamento. Para compor o ensaio no presente trabalho, foram empregados 10 peixes por tratamento.

Quando os peixes adquiridos atingiram um peso vivo médio em torno da faixa de 100 g, em junho de 2007, 100 indivíduos foram selecionados para compor o ensaio com a medicação a base de OTC. Esses peixes foram transferidos para um outro tanque com capacidade igual (16 m<sup>3</sup>) e mesmos sistemas de recirculação de água e aeração, enquanto que os outros se mantiveram naquele mesmo tanque, compondo o grupo controle do ensaio. Faz-se importante salientar que a mesma água circulava por todos os tanques envolvidos no experimento, de modo a não haver diferença ambiental significativa entre os animais participantes do ensaio e do grupo controle.

Os 100 peixes selecionados foram por apresentarem características de tamanho e peso semelhantes. Para tanto, por vez, 10 peixes foram selecionados do grupo contendo os cerca de 400 animais, mergulhados em um recipiente contendo o anestésico benzocaína, na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, pesados

juntos, e de um deles foram tiradas medidas de comprimento total e padrão (comprimento do peixe desconsiderando a cauda) (Tabela IV.3). Depois de tomadas as medidas, os 10 peixes foram separados em gaiolas com capacidade de 0,24 m<sup>3</sup> (Figura IV.2). As 10 gaiolas usadas para alocar os 100 peixes do ensaio foram mantidas em um outro tanque semelhante aos utilizados para comportar os peixes restantes. A divisão dos peixes em gaiolas teve como objetivo amenizar, tanto quanto possível, o efeito da competição entre os peixes pelo alimento durante o período de fornecimento da ração adicionada do medicamento à base de OTC, permitindo, assim, que os animais ingerissem uma quantidade semelhante de ração adicionada do medicamento. Após essa divisão dos peixes em gaiolas, os mesmos foram mantidos assim, com fornecimento da ração comercial Nutripeixe Crescimento (Purina®) por um período de uma semana para adaptação. Na semana seguinte esses animais passaram a receber a mesma ração comercial, porém depois de submetida ao mesmo procedimento promovido para a adição do medicamento à base de OTC, porém sem a adição desse medicamento, para que os animais se adaptassem à ração processada por um período de uma semana.



**Figura IV.2** - Gaiolas utilizadas para conter os peixes no ensaio.

Para o ensaio de estudos da depleção de OTC da carne dos peixes, estabeleceu-se que os animais receberiam a medicação (Terramicina<sup>®</sup>) via ração na dose diária de 80 mg OTC (kg PV)<sup>-1</sup>.

O tratamento com a medicação foi iniciado simultaneamente para todos os peixes durante cinco dias consecutivos, em julho de 2007. No entanto, o abate dos animais ocorreu em tempos diferentes após o tratamento. Cada uma das gaiolas empregadas no ensaio representou um intervalo de dia(s) após o tratamento com a medicação. Os períodos avaliados foram de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20 e 25 dias após o tratamento com a medicação.

Após o período de tratamento com a medicação, os peixes voltaram a receber a ração não medicada. Durante todo o ensaio os animais receberam uma quantidade diária de ração correspondente a 3 % do peso vivo, com fornecimento dividido em duas partes iguais: de manhã (entre 8 e 9 h) e a tarde (entre 16 e 17 h).

No primeiro dia de fornecimento da ração adicionada da medicação à base de OTC aos peixes e ao final do ensaio, alguns parâmetros indicadores das condições ambientais da água do tanque foram medidos através de um “kit” comercial (Kit Produtor para Aqüicultura de Água Doce, da Alfakit Ltda - Florianópolis/SC) por meio do qual foram avaliados: pH, oxigenação, alcalinidade total, dureza da água, concentração amoniacal total. A temperatura foi medida diariamente durante todo o período do ensaio, desde o primeiro dia de fornecimento da medicação. Todos os parâmetros avaliados (Tabela IV.4) se apresentaram dentro das recomendações apontadas em KUBITZA (2000) como sendo adequadas para a criação de tilápias, à exceção da temperatura cuja faixa ideal recomendada para a criação é entre 27 a 32 °C. Porém, cabe destacar que o ensaio (fornecimento da medicação via ração aos peixes) ocorreu entre os meses de julho a agosto de 2007, portanto, no inverno, estação em que as temperaturas do meio ambiente são mais baixas, e os animais apresentam uma diminuição na taxa metabólica, o que resulta num menor consumo de alimento, fase em que se tornam mais suscetíveis ao surgimento de doenças e, portanto, período mais propício ao uso de medicação antimicrobiana.

**Tabela IV.3** - Medidas de peso (n=10), comprimentos totais (CT) e padrões (CP) dos peixes no início do ensaio.

<b>Gaiola</b>	<b>Peso Vivo Total (g)</b>	<b>Peso Vivo Médio dos Peixes (g)</b>	<b>CT* (cm)</b>	<b>CP* (cm)</b>
<b>1</b>	1061,15	106,1	18,5	15,3
<b>2</b>	1065,56	106,5	17,8	14,5
<b>3</b>	975,55	97,5	17,8	14,9
<b>4</b>	1149,73	114,9	18,5	14,8
<b>5</b>	1147,7	114,7	18,5	15,3
<b>6</b>	1030,28	103,0	18,0	14,7
<b>7</b>	1032,86	103,2	16,3	13,5
<b>8</b>	947,99	94,7	17,3	14,4
<b>9</b>	1030,45	103,0	17,7	14,5
<b>10</b>	931,55	93,1	18,1	14,9

(\*) Medida realizada para um peixe da gaiola.

**Tabela IV.4** - Parâmetros físico-químicos da água dos tanques durante o ensaio.

<b>PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS</b>				
	<b>Temperatura*</b> (°C)	<b>pH</b>	<b>Oxigênio Dissolvido</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>Concentração Amoniacal</b> (mg L <sup>-1</sup> )
<b><i>Início do Tratamento com a Medicação (Início do Ensaio)</i></b>				
	22,0 – 24,5	7	6,1	0,1
<b><i>Período de Avaliação da Depleção da OTC</i></b>				
<b>DIA 1</b>	21,5 – 24,0	7	6,1	0,1
<b>DIA 2</b>	22,5 – 24,5			
<b>DIA 3</b>	22,5 – 24,5			
<b>DIA 4</b>	22,5 – 23,0			
<b>DIA 5</b>	21,0 – 23,0	8	6,1	0,1
<b>DIA 8</b>	21,5 – 24,0			
<b>DIA 10</b>	21,0 – 22,0			
<b>DIA 15</b>	20,5 – 20,5			
<b>DIA 20</b>	19,0 – 20,0			
<b>DIA 25</b>	16,5 – 20,1	7	6,0	0,1

\* As temperaturas eram medidas duas vezes ao dia, antes do fornecimento da ração: de manhã (9 h) e a tarde (16 h).

#### **IV.3.6.5. Coleta da carne de peixe**

Na ocasião do abate por choque térmico, os peixes de uma mesma gaiola foram recolhidos com o auxílio de uma rede, e colocados em um recipiente contendo água e gelo, a uma temperatura próxima de 0-2 °C.

Individualmente, os peixes foram pesados, e suas medidas de comprimentos (total e padrão) tomadas. Na seqüência, foi realizado o procedimento de retirada das vísceras, da pele, e finalmente, dos filés de carne (Figura IV.3). A carne de cada peixe foi dividida em pequenas porções de aproximadamente 5 g cada, em sacos plásticos apropriados para o armazenamento em freezer (- 18 °C), onde foram mantidos até a execução das determinações da concentração de OTC. A Tabela IV.5 apresenta dos dados de peso e comprimentos totais e padrão de todos os peixes abatidos.



**Figura IV.3** - Fotografias da seqüência de procedimentos para a coleta da carne dos peixes.

Como pode ser verificado na Tabela IV.5, não foram tomadas as medidas dos peixes das gaiolas 8, 9 e 10, que representariam os períodos de 15, 20 e 25 dias após o término do tratamento com a medicação, pois esses peixes não foram abatidos. Isso ocorreu porque os resultados das análises das amostras dos peixes da gaiola 7 (10 dias após a medicação) já apresentavam níveis de resíduos de OTC abaixo do limite de detecção do método desenvolvido, conforme será apresentado adiante no item IV.5.3 (p.141).

**Tabela IV.5** - Medidas de peso e comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) dos peixes logo após o abate.

	PEIXES	PESO (g)	CT (cm)	CP (cm)		PEIXES	PESO (g)	CT (cm)	CP (cm)		PEIXES	PESO (g)	CT (cm)	CP (cm)
<b>GAIOLA - 1</b>	1.1	119,1	18,8	15,5	<b>GAIOLA - 2</b>	2.1	117,8	18,5	14,8	<b>GAIOLA - 3</b>	3.1	135,8	18,4	14,7
	1.2	123,9	19,8	16,3		2.2	137,6	19,0	15,3		3.2	138,1	18,5	14,8
	1.3	116,2	18,0	14,9		2.3	122,1	18,4	14,7		3.3	107,8	17,7	14,0
	1.4	132,1	19,0	15,8		2.4	124,5	17,6	14,3		3.4	126,4	18,3	14,7
	1.5	126,6	18,7	15,5		2.5	125,2	18,8	15,0		3.5	97,2	16,9	13,4
	1.6	125,7	18,0	14,5		2.6	133,3	19,0	15,0		3.6	100,2	17,5	14,2
	1.7	134,0	19,4	15,5		2.7	139,8	19,5	15,9		3.7	129,4	18,7	15,0
	1.8	90,3	17,7	14,2		2.8	119,3	17,4	13,5		3.8	129,4	18,7	15,0
	1.9	108,5	18,5	14,8		2.9	122,6	18,5	14,8		3.9	112,6	17,8	14,4
	1.10	92,5	17,1	13,5		2.10	91,0	16,6	13,4		3.10	93,9	17,0	13,3
<b>GAIOLA - 4</b>	4.1	141,7	19,5	15,7	<b>GAIOLA - 5</b>	5.1	170,1	20,7	16,6	<b>GAIOLA - 6</b>	6.1	134,8	18,8	15,1
	4.2	148,9	20,4	16,3		5.2	149,4	20,4	16,1		6.2	139,0	20,0	15,8
	4.3	136,6	18,6	15,4		5.3	148,2	20,2	16,8		6.3	133,3	18,8	15,2
	4.4	134,7	19,6	16,1		5.4	156,5	21,0	16,8		6.4	128,2	19,0	15,5
	4.5	146,8	20,3	16,2		5.5	129,3	19,0	15,2		6.5	188,3	22,5	18,0
	4.6	173,0	21,1	16,9		5.6	138,0	18,5	14,8		6.6	108,2	17,9	14,9
	4.7	86,0	16,9	13,4		5.7	140,8	19,8	15,6		6.7	112,7	18,4	14,7
	4.8	156,8	21,0	16,8		5.8	118,8	18,2	14,5		6.8	97,5	17,5	14,3
	4.9	129,8	18,8	15,0		5.9	115,0	19,0	14,8		6.9	111,8	18,5	14,6
	4.10	115,5	18,3	14,4		5.10	114,2	19,0	15,4		6.10	102,8	18,0	14,5
<b>GAIOLA - 7</b>	7.1	147,2	20,5	16,5										
	7.2	146,8	19,1	15,4										
	7.3	160,1	20,0	16,2										
	7.4	164,5	19,5	15,8										
	7.5	155,8	20,5	16,4										
	7.6	141,8	20,0	16,3										
	7.7	119,0	18,1	14,7										
	7.8	94,8	17,3	14,0										
	7.9	100,5	17,2	13,8										
	7.10	96,8	18	14,7										

#### IV.4. Procedimento analítico

##### IV.4.1. Método para a determinação de OTC na ração

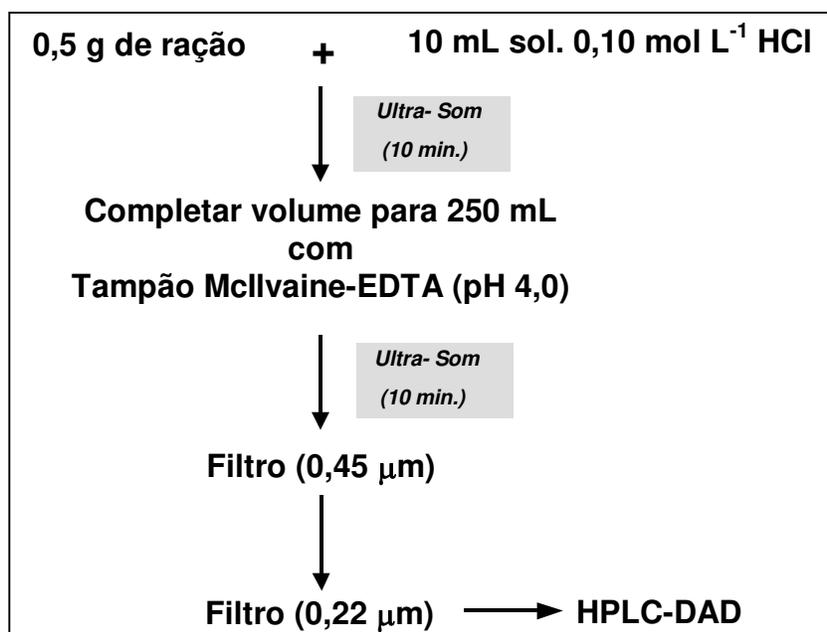
###### IV.4.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico

As separações cromatográficas para a quantificação de OTC na ração, fazendo uso de TC como padrão interno, foram feitas utilizando-se como fase estacionária a coluna analítica de fase reversa XTerra-A (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Waters, EUA). A fase móvel foi composta por uma mistura de MeOH e ACN (1:1, v/v) e solução aquosa contendo acetato de sódio (0,0375 mol L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,0175 mol L<sup>-1</sup>) e EDTA (0,0125 mol L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para 7,0. A eluição foi ajustada para a separação do analito (OTC), do padrão interno empregado (TC) e de eventuais interferentes da amostra. Foi empregado um detector de arranjo de fotodiodos (DAD). A alça de amostragem foi de 50  $\mu\text{L}$ .

As condições de separação cromatográfica foram avaliadas a partir dos parâmetros de conformidade do sistema, preconizando como sendo adequados ao objetivo do método as faixas de valores preconizados ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ), apresentadas na Tabela III.1 (p.46).

###### IV.4.1.2. Preparo da amostra de ração

A uma quantidade de 0,5 g de ração foram adicionados 10 mL de solução HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e a mistura foi levada ao ultra-som por 10 minutos. Em seguida o volume foi completado para 250 mL com solução tampão McIlvaine (pH 4,0) contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de EDTA e a solução foi recolocada no ultra-som por mais 10 minutos. Uma alíquota de aproximadamente 15 mL do sobrenadante foi filtrada em papel de filtro quantitativo (Whatman, 0,45  $\mu\text{m}$ ), seguida por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Um volume de 50  $\mu\text{L}$  foi injetado no sistema cromatográfico. Um esquema do procedimento de extração descrito é representado na Figura IV.4.



**Figura IV.4** - Esquema geral do procedimento de extração de OTC na ração.

Para a avaliação das condições estudadas no procedimento de preparo de amostra, foram analisadas as eficiências de extração de OTC e TC. Para tanto, fez-se a fortificação da amostra de ração com os analitos em solução padrão antes de se iniciar o procedimento de preparo da amostra. Os resultados obtidos foram avaliados por uma curva analítica externa (fora da matriz), desenvolvida com os analitos em soluções padrão. Esses resultados foram transformados em porcentagens das concentrações esperadas, isto é, porcentagens das concentrações das respectivas soluções padrão usadas na fortificação da amostra. Todos os testes foram desenvolvidos em duplicatas.

O procedimento de preparo de amostra foi otimizado para garantir a seletividade do método, sem, contudo, prejudicar a eficiência de extração.

### **IV.4.1.3. Validação do método analítico**

O método foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão. Os três primeiros parâmetros foram obtidos a partir da curva analítica.

#### **IV.4.1.3.1. Seletividade**

A seletividade do método desenvolvido foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e para amostra branco fortificada com a OTC e o padrão interno (TC), ambos as tetraciclina a  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ , verificando a presença de interferentes da matriz que pudessem estar coeluinto com os analitos. Como critério de aceitação foi estabelecido que as repostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos deveriam ser inferiores a 20 % das repostas dos respectivos limites de quantificação.

#### **IV.4.1.3.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade**

A curva analítica foi elaborada fortificando amostras branco em cinco níveis de concentração de OTC:  $3,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $6,0 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $7,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , com o padrão interno (TC) na concentração de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  em todos os níveis. Para a fortificação foi usado 0,5 g de amostra branco de ração, que recebeu a adição de 1 mL das soluções de trabalho dos analitos diluídas em solução aquosa (pH 7,0) contendo acetato de sódio ( $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$ ), cloreto de cálcio ( $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ ) e EDTA ( $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ ), de modo a se obter as concentrações apontadas acima. Após a etapa de fortificação da matriz, as amostras passaram pelo preparo descrito na Figura IV.4 (p.111).

A linearidade (coeficiente de correlação linear,  $r$ ) e a sensibilidade (coeficiente angular) foram obtidas através da curva analítica.

#### *IV.4.1.3.3. Precisão*

A precisão do método desenvolvido foi dividida em duas medidas: precisão intra- e inter-ensaios.

A precisão intra-ensaio foi obtida para um nível de concentração ( $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, analisada em quintuplicata ( $n = 5$ ) em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressa como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A precisão inter-ensaio foi obtida para três níveis de concentração (4, 5 e  $6 \mu\text{g g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e o resultado foi expresso como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

#### *IV.4.1.3.4. Exatidão*

A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, a 0,5 g de amostras branco de ração foi adicionado de 1 mL de solução contendo OTC e TC (ambas a  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), equivalendo portanto a  $5 \mu\text{g}$  de OTC e TC por g de ração, com três repetições, uma em cada dia diferente ( $n = 3$ ). Os resultados foram transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos, após desenvolvimento do procedimento de extração.

### ***IV.4.2. Método para a determinação de OTC na carne de peixe***

#### ***IV.4.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico***

As separações cromatográficas para a quantificação de OTC na carne de peixe, fazendo uso de NOR como padrão interno, foram realizadas utilizando-se como fase estacionária a coluna analítica de fase reversa XTerra-A,  $C_{18}$ , 250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Waters, EUA). A fase móvel foi composta por uma mistura de MeOH e ACN (1:1, v/v) e solução aquosa contendo acetato de sódio ( $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$ ),

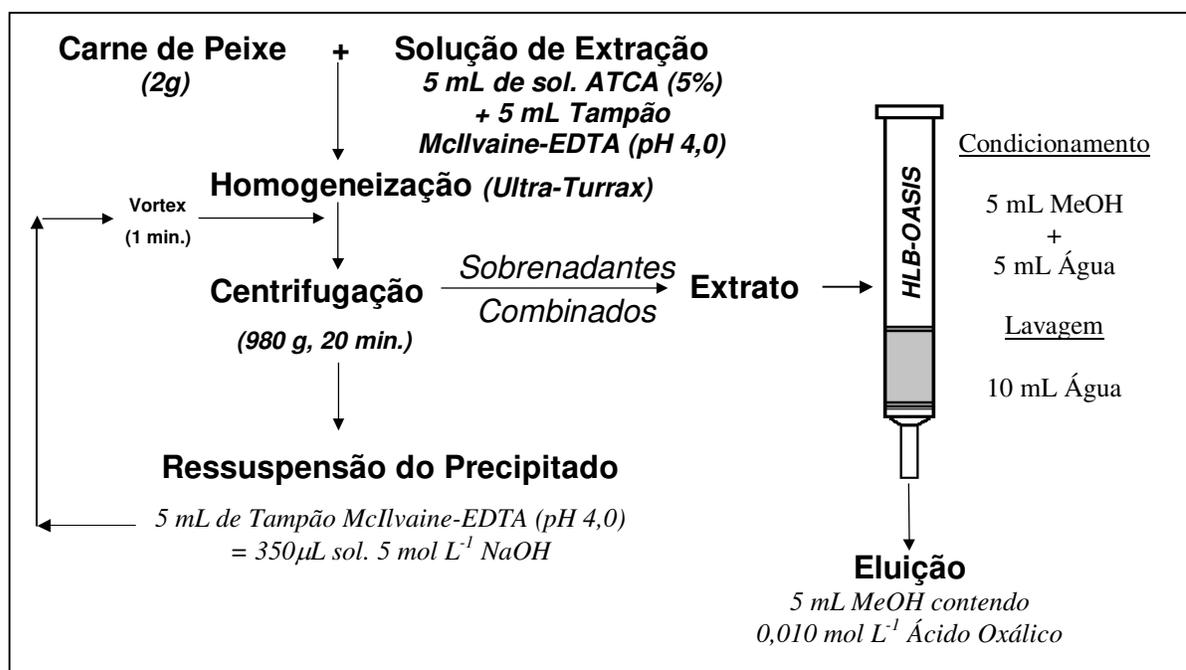
cloreto de cálcio ( $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ ) e EDTA ( $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ ), com pH ajustado para 7,0. A eluição foi ajustada para a separação do analito (OTC), do padrão interno empregado (NOR) e de eventuais interferentes da amostra. Foi empregado um sistema cromatográfico associado a detector de arranjo de fotodiodos (DAD), conectado em série a um detector de fluorescência multi-canal. Uma alça de amostragem para um volume de injeção de  $50 \mu\text{L}$  foi empregada.

As condições de separação cromatográfica foram avaliadas a partir dos parâmetros de conformidade do sistema, preconizando como sendo adequadas ao objetivo do método as faixas de valores preconizadas ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ), apresentadas na Tabela III.1 (p.46).

#### **IV.4.2.2. Preparo de amostra de carne de peixe**

A Figura IV.5 apresenta um esquema geral do procedimento de extração de OTC desenvolvido para a carne de peixe.

Para uma quantidade de 2,0 g de filé de tilápia foram adicionados 5 mL de solução de ácido tricloroacético a 5 % (v/v), mais 5 mL de tampão McIlvaine (pH 4,0) contendo EDTA na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A mistura foi homogeneizada em Ultra-Turrax. Na seqüência, a mistura foi centrifugada a 980 g por 20 minutos. O sobrenadante foi então separado, ao qual foram adicionados mais 5 mL de tampão McIlvaine-EDTA (pH 4,0) e  $350 \mu\text{L}$  de solução de NaOH  $5 \text{ mol L}^{-1}$ . A limpeza (*clean-up*) do extrato foi realizada em cartucho de SPE (HLB-OASIS, 500 mg, 6 mL), previamente condicionado com 5 mL de MeOH e 5 mL de água. A OTC foi eluída com 5 mL de solução de MeOH contendo  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  ácido oxálico. O solvente do eluato foi evaporado em banho-maria ( $\sim 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sob fluxo de  $\text{N}_2$ . Em seguida os analitos foram ressuspensos em 1,0 mL da solução aquosa contendo acetato de sódio ( $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$ ), cloreto de cálcio ( $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ ) e EDTA ( $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ ), com pH ajustado para 7,0.



**Figura IV.5** - Esquema geral do procedimento de extração de OTC em carne de peixe.

Para avaliação das condições estudadas no procedimento de preparo de amostra, foram analisadas as eficiências de extração de OTC e NOR. Para tanto, fez-se a fortificação da amostra de carne de peixe com os analitos em solução padrão antes de se iniciar o procedimento de preparo da amostra. Os resultados obtidos foram avaliados por curvas analíticas externas (fora da matriz), desenvolvida com os analitos em soluções padrão. Esses resultados foram transformados em porcentagens das concentrações esperadas, isto é, porcentagens das concentrações das respectivas soluções padrão usadas na fortificação da amostra. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

O procedimento de preparo de amostra foi otimizado para garantir a seletividade do método, sem, contudo, prejudicar a eficiência de extração.

### **IV.4.2.3. Validação do método analítico**

A validação do método para a determinação de OTC em carne de peixe foi feita pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), tendo com base, principalmente, as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2003) e Comunidade Européia (EC, 2002) para análise de resíduos em alimentos.

#### **IV.4.2.3.1. Seletividade**

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco e para amostra fortificada com a OTC e o padrão interno (NOR), nas concentrações de 150 e 25 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, submetidas ao processo de extração descrito na Figura IV.5 (p.115), com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem comprometer a determinação de cada um dos antimicrobianos. Como critério de aceitação foi estabelecido que as repostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos deveriam ser inferiores a 20 % das repostas dos respectivos limites de quantificação.

#### **IV.4.2.3.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade**

A curva analítica foi obtida mediante fortificação de amostras branco (carne de tilápias do grupo controle) em cinco níveis de concentração (50, 100, 150, 200 e 300 ng g<sup>-1</sup>) usando a NOR como padrão interno na concentração de 25 ng g<sup>-1</sup>. Para a fortificação das amostras branco foram empregadas soluções estoques dos analitos, diluídas em solução aquosa contendo acetato de sódio (0,0375 mol L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,0175 mol L<sup>-1</sup>) e EDTA (0,0125 mol L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para 7,0.

A linearidade (coeficiente de correlação linear,  $r$ ) e a sensibilidade (coeficiente angular) foram obtidas através da curva analítica.

#### IV.4.2.3.3. Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) do método foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 3, no tempo de retenção da OTC, em amostras branco de carne de peixe ( $n = 3$ ).

#### IV.4.2.3.4. Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) do método foi determinado a partir da razão sinal/ruído igual a 10, no tempo de retenção da OTC, em amostras branco de carne de peixe ( $n = 3$ ).

#### IV.4.2.3.5. Precisão

A precisão obtida para a oxitetraciclina foi avaliada em situação de intra- e inter-ensaios.

A precisão intra-ensaio foi obtida para um nível de concentração ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, analisada em quintuplicatas ( $n = 5$ ) em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressa como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A precisão inter-ensaio foi obtida para três níveis de concentração ( $100$ ,  $150$  e  $200 \text{ ng g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e o resultado foi expresso como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

#### IV.4.2.3.6. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tanto, amostras branco foram fortificadas com a OTC e a NOR, em concentrações correspondentes ao terceiro nível da curva analítica (150 e 25 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente), com três repetições em dias diferentes (n = 3). Os resultados foram transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos, após desenvolvimento do procedimento de extração.

### IV.5. Resultados e Discussão

#### IV.5.1. Método para a determinação de OTC na ração

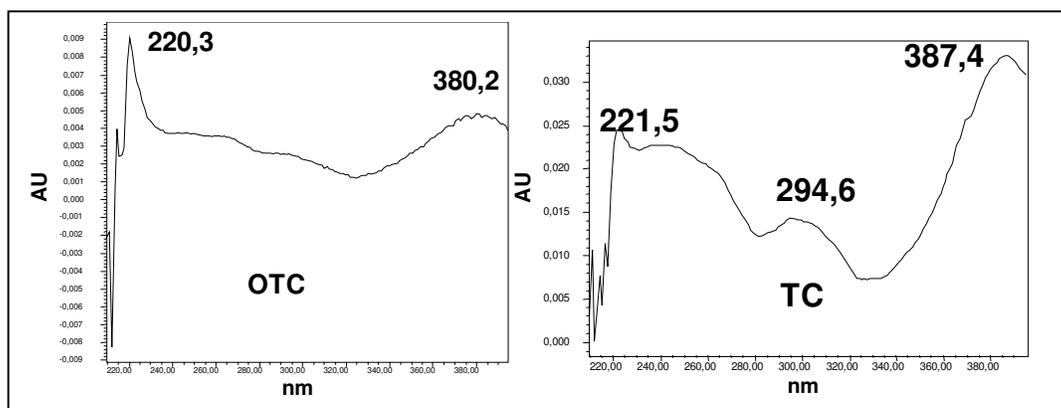
##### IV.5.1.1. Desenvolvimento do método cromatográfico

Segundo a literatura, de um modo geral, as tetraciclinas são separadas em colunas cromatográficas de fase reversa. No entanto, a interação das tetraciclinas com grupos silanóis e traços de metais presentes em típicas colunas empacotadas à base de sílica (C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>) contribui significativamente com a assimetria (surgimento de cauda) dos picos cromatográficos. Desta forma, colunas cromatográficas capeadas ou colunas de fase polimérica têm ganhado destaque de uso com o propósito de separar tetraciclinas (OKA *et al*, 2000). Diante disso, o presente trabalho selecionou para compor as análises de determinação de OTC na ração, uma coluna analítica de fase reversa híbrida (polímero e sílica), comercializada pela Waters (EUA), sob nome comercial de XTerra-A, C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm).

Para compor a fase móvel, tomou-se como referência o trabalho de MAMANI (2007), que indica para a separação de tetraciclinas uma fase orgânica (FO), representada pela mistura de MeOH e ACN (1:1, v/v) e uma fase aquosa (FA), representada pela solução aquosa contendo acetato de sódio (0,0375 mol L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>), cloreto de cálcio ( $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ ) e EDTA ( $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ ), com pH ajustado para 7,0.

O sistema de detecção empregado foi o de absorção no ultra-violeta (DAD). Os espectros característicos obtidos na fase móvel para a OTC e TC estão apresentados na Figura IV.6.

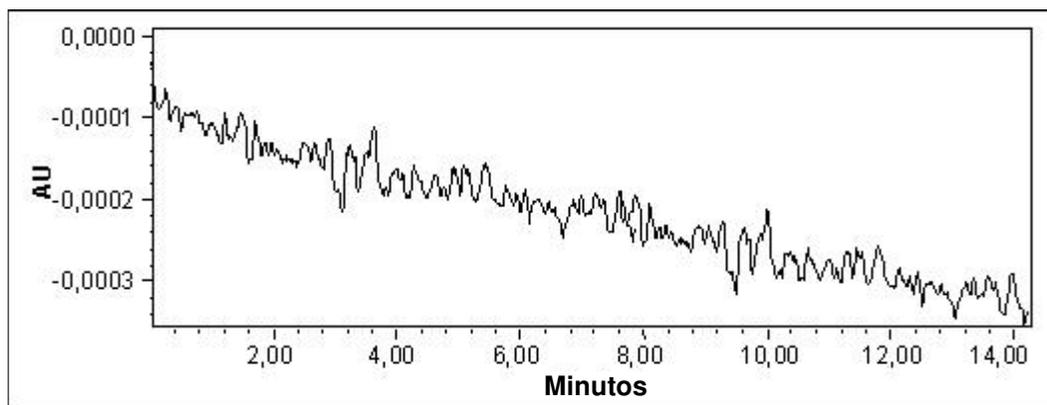


**Figura IV.6** - Espectros de absorção no DAD obtidos para OTC e TC na fase móvel selecionada.

A partir dos espectros da Figura IV.6 foi selecionado o comprimento de onda de 380 nm para monitorar ambas as tetraciclinas.

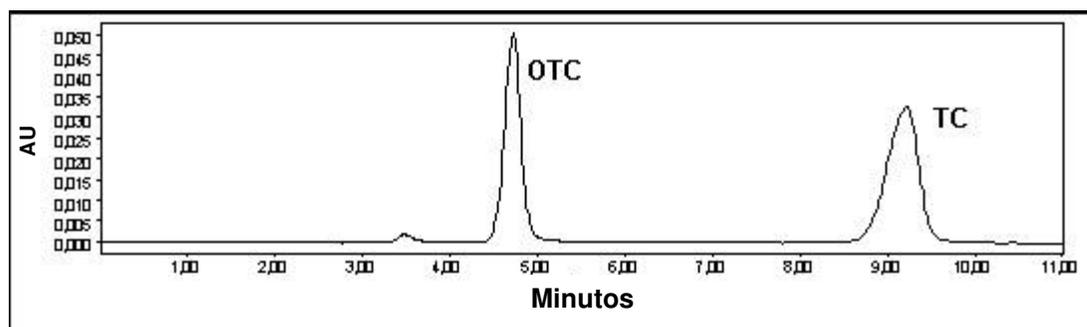
Para avaliar a seletividade do método cromatográfico, a amostra branco de ração foi submetida à execução do procedimento de preparo de amostra (Figura IV.4, p.111), e em seguida analisada pelo método cromatográfico. A partir dos resultados obtidos, verificou-se a inexistência de interferentes que pudessem comprometer a análise da mesma (Figura IV.7). A ração utilizada neste estudo foi a mesma que foi empregada no ensaio com as tilápias (Nutripeixe Crescimento, Purina®) para veicular o fármaco.

Diante da inexistência de interferentes observada, a proporção entre FA e FO da fase móvel passou a ser definida tomando como objetivo o menor tempo possível de corrida cromatográfica, sem comprometer as faixas de valores dos parâmetros cromatográficos preconizados como sendo adequados ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ). A eluição foi isocrática 60:40 (FA:FO, v/v), na vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .



**Figura IV.7** - Cromatograma da amostra branco de ração, após o procedimento de extração. FE: XTerra-A. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,0175 mol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,0125 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0) e FO (MeOH). Eluição isocrática: (FA:FO 60:40v/v). Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>.  $\lambda$ : 380 nm.

Um cromatograma característico da separação de OTC e TC em amostra branco de ração fortificada com esses antimicrobianos, ambos na concentração de 5  $\mu\text{g g}^{-1}$ , é apresentado na Figura IV.8.



**Figura IV.8** - Cromatograma da separação de OTC (5,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e TC (5,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) da amostra de ração enriquecida com OTC. FE: XTerra-A. FM: FA (acetato de sódio 0,0375 mol L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,0175 mol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,0125 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0) e FO (MeOH). Eluição isocrática: (FA:FO 60:40v/v). Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>.  $\lambda$ : 380 nm.

A Tabela IV.6 discrimina os parâmetros de conformidade do sistema obtidos para as condições selecionadas.

**Tabela IV.6** - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.

Analito	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub>	F <sub>s</sub>	α	k	N
OTC	4,72	-	0,99	-	1,25	3014
TC	9,22	8,9	0,82	2,71	3,39	3050

Os valores para os parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela IV.6 foram obtidos através do programa *System Suitability* (software Millennium 3.2, Waters, EUA), e os resultados indicam que as condições estabelecidas são consideradas adequadas para os objetivos a que se propõe o método conforme previamente preconizado ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ).

#### **IV.5.1.2. Preparo da amostra de ração**

Métodos analíticos descritos na literatura que utilizam HPLC para a determinação de antimicrobianos na ração, ou mesmo em medicamentos com formulação em pós-solúveis ou comprimidos, relatam procedimentos de extração dos analitos desses tipos de matriz empregando a extração sólido-líquido.

Para a determinação de OTC na ração foi usado um procedimento de preparo de amostra simplificado em relação ao descrito em NAMDARI *et al* (1996). Para tanto, seguiu-se o mesmo procedimento descrito de extração sólido-líquido, mas sem envolver a etapa complementar de limpeza do extrato por SPE descrito naquele artigo. Um esquema geral do procedimento de extração de OTC na ração já foi descrito na Figura IV.4 (p.111).

O procedimento de preparo de amostra de ração delineado foi avaliado a partir de análise das eficiências de extração obtidas para OTC e TC.

Para tanto, fez-se a fortificação da amostra de ração com OTC e TC em soluções padrão (ambos na concentração de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n = 5$ ) antes de se iniciar o procedimento de preparo da amostra. Os resultados obtidos foram avaliados por curvas analíticas externas (fora da matriz), desenvolvida com os analitos em soluções padrão. Esses resultados foram então transformados em porcentagens

das respectivas concentrações esperadas, isto é, porcentagens das concentrações das respectivas soluções padrão usadas na fortificação da amostra. Todos os testes foram desenvolvidos em duplicatas. Os resultados de eficiência de extração obtidos para ambos os analitos foram de aproximadamente 100 % (97 a 101 %), indicando não haver perdas dos antimicrobianos durante o processo de preparo da amostra de ração.

#### **IV.5.1.3. Validação do método analítico**

Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) usados para avaliar o método de separação desenvolvido para a quantificação do antimicrobiano na ração são: seletividade, linearidade, sensibilidade, faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

Cabe destacar que, por se tratar de um método desenvolvido para quantificar um componente majoritário, não se fez necessário o estabelecimento de um LOQ, ou mesmo um LOD para o método, já que a detectabilidade do método não é crítica para a avaliação do mesmo.

##### **IV.5.1.3.1. Seletividade**

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra. Disto, uma comparação dos cromatogramas obtidos a partir de amostra branco de ração e da amostra branco fortificada com a OTC e o padrão interno (TC), ambos as tetraciclina a  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ , apresentados nas Figuras IV.7 e IV.8 (p.120), comprovam a seletividade do método frente à ausência de interferentes presentes na ração.

#### IV.5.1.3.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

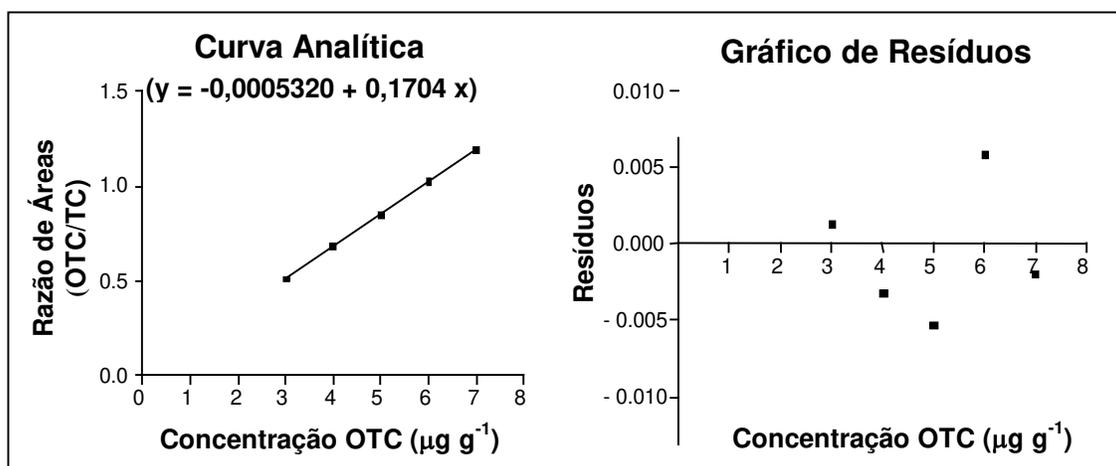
Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito à qual o método pode ser aplicado, a qual é avaliada a partir da curva analítica. No caso de análises de um composto majoritário como o princípio ativo de um medicamento, a faixa linear é limitada pelos níveis inferior e superior de concentração empregados no estabelecimento da curva analítica.

A curva analítica foi construída mediante fortificação de amostras branco de ração em cinco níveis de fortificação (OTC: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; TC: 5,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Após a fortificação, as amostras foram submetidas ao procedimento de preparo descrito na Figura IV.4 (p.111).

A linearidade foi expressa pelo coeficiente de regressão linear da curva analítica, e o resultado foi superior a 0,99. A ANVISA (2003) preconiza que o coeficiente de correlação linear deva ser igual ou superior a 0,98, e a Comunidade Européia 0,99 (EC 2002).

A curva analítica obtida para a quantificação da OTC em ração é representada pela equação  $y = -0,0005320 + 0,1704 x$ .

Considerando a linearidade e a dispersão dos resultados apresentados na Figura IV.9, fica comprovada a adequação do método desenvolvido para a faixa linear de trabalho de concentrações de OTC na ração de 3 a 7  $\mu\text{g g}^{-1}$ .



**Figura IV.9** – Curva analítica para da determinação de OTC na ração e o respectivo gráfico de resíduos.

#### IV.5.1.3.3. Precisão

Para avaliar a precisão do método desenvolvido, o procedimento ocorreu da seguinte forma:

Precisão intra-ensaio: foi obtida para um nível de concentração ( $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, analisada em quintuplicata ( $n = 5$ ) em um mesmo dia, pelo mesmo analista, e no mesmo equipamento. A precisão intra-ensaio expressa como desvio padrão relativo (RSD) foi de 0,02 %.

Precisão inter-ensaio: foi obtida para três níveis de concentração ( $4, 5$  e  $6 \mu\text{g g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e o resultado, expresso como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD), foi de 0,68 % ( $4 \mu\text{g g}^{-1}$ ); 0,50 % ( $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ); e 0,42 % ( $6 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

#### IV.5.1.3.4. Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada mediante teste de recuperação, com amostras branco de ração fortificadas com OTC e TC (ambas a  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), repetidas em dias diferentes ( $n = 3$ ). Os resultados obtidos,

transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos após desenvolvimento do procedimento de extração, variaram na faixa de 101 a 103 %.

A Tabela IV.7 sumariza os resultados obtidos dos parâmetros de validação para o método desenvolvido para determinação de OTC em ração.

**Tabela IV.7** - Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para determinação de OTC na ração por HPLC-DAD (380 nm).

<b>Parâmetros</b>	<b>OTC</b>
<b>Faixa linear (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>	3,0-7,0
<b>Linearidade</b>	0,9998
<b>Sensibilidade (<math>\mu\text{a g ng}^{-1}</math>)</b>	0,1704
<b>Intra-Ensaio (RSD %)</b>	
<b>5,0 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> (n = 5)</b>	0,02
<b>Inter-Ensaio (RSD %)</b>	
<b>Precisão</b> <b>4,0 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> (n = 5)</b>	0,68
<b>5,0 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> (n = 5)</b>	0,50
<b>6,0 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math> (n = 5)</b>	0,42
<b>Exatidão (% Recuperação)</b>	
<b>5,0 <math>\text{ng g}^{-1}</math> (n = 3)</b>	101-103

Os resultados da Tabela IV.7 se apresentaram satisfatórios ao que se propõe o método desenvolvido, ou seja, quantificação de OTC na ração a ser usada para a medicação dos peixes no ensaio.

Infelizmente, o trabalho publicado por NAMDARI *et al* (1996), no qual foi baseado o procedimento de extração da OTC da ração, não apresenta os resultados de validação do método aplicado. O mesmo ocorreu em trabalhos semelhantes desenvolvidos por MEINERTZ *et al* (2001) e BERNARDY *et al* (2003). Esses três trabalhos mencionados descrevem procedimentos de extração

de OTC em ração e em carne de peixe, mas apenas os resultados de validação do método desenvolvido para a carne de peixe são discutidos.

#### **IV.5.1.4. Análise da ração adicionada de OTC**

Após devidamente validado o método para a determinação de OTC na ração, empregando HPLC-DAD, procedeu-se a análise em triplicata da ração preparada com a adição de OTC, conforme descrito em IV.3.6.3, onde se obteve-se o resultado de concentração de OTC de 3,3 mg por g de ração produzida. Considerando que foram adicionados 180 g do medicamento Terramicina® (5,5 % de OTC) a 3 kg de ração, o resultado obtido da análise da ração não revelou perdas de OTC durante o processo de adição desse antimicrobiano na ração. Disto, considerando a dose estabelecida para medicação diária dos peixes de 80 mg por kgPV, mais o peso médio (kgPV) de cada gaiola conforme apresentado na Tabela IV.5 (p.109), pôde-se estabelecer a quantidade de ração preparada com OTC a ser fornecida para os peixes, bem como o complemento (quantidade) de ração sem a adição de OTC necessária para manter o fornecimento diário de ração equivalente a 3% do PV.

#### ***IV.5.2. Método para a determinação de OTC na carne de peixe***

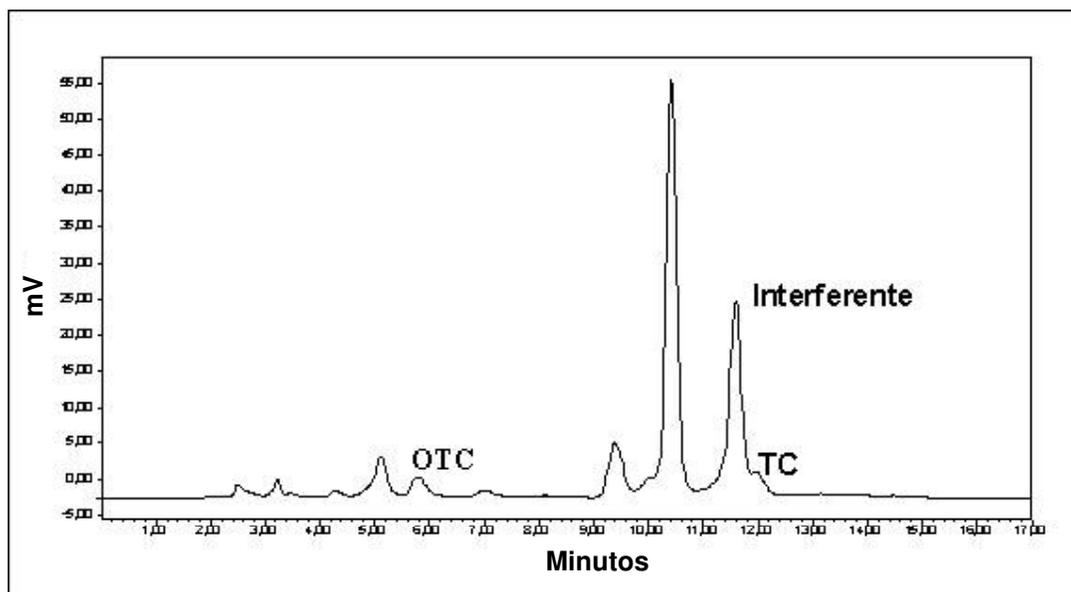
##### **IV.5.2.1. Desenvolvimento do método cromatográfico**

Para a análise cromatográfica de OTC em carne de peixe, foram tomadas inicialmente as condições estabelecidas no método desenvolvido para determinação desse mesmo antimicrobiano na ração. A fase móvel foi composta pela mistura MeOH:ACN (1:1, v/v), como componente orgânico (FO), e solução aquosa contendo acetato de sódio (0,0375 mol L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,0175 mol L<sup>-1</sup>) e EDTA (0,0125 mol L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para 7, como componente aquoso (FA). A fase estacionária empregada foi a coluna XTerra-A (250 X 4,6 mm, 5 µm, Waters, EUA).

No entanto, como agora o método visa a determinação de OTC em nível de resíduos (LMR 100 ng g<sup>-1</sup>), fez-se necessário o emprego de um sistema de detecção com maior detectabilidade e seletividade do que o detector de arranjo de diodos (DAD). Para tanto, foi selecionado o detector de fluorescência. A diferença de sensibilidade entre ambos os sistemas será mais bem discutida e comprovada adiante.

Foram feitos diversos testes para a seleção de um gradiente de eluição da fase móvel, visando a melhor separação entre analitos e interferentes da matriz e o menor tempo de corrida cromatográfica possíveis, sem comprometer as faixas de valores dos parâmetros cromatográficos preconizados como sendo adequados ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ). Cabe salientar que para otimizar o método quanto à separação dos analitos de possíveis interferentes presentes na matriz tiveram que ser previamente definidas as condições de preparo de amostra (discutidas mais adiante, no item IV.5.2.2, p.134). Embora, a maioria dos protocolos de validação recomenda a avaliação da seletividade durante a etapa de validação, consideramos que não é possível otimizar o método sem avaliação deste parâmetro.

O padrão interno inicialmente escolhido para compor o método desenvolvido para a determinação de OTC e carne de peixe foi a tetraciclina (TC), semelhante ao ocorrido para o método desenvolvido para análise em ração. No entanto, por problemas de coeluição da TC com interferentes da matriz na separação cromatográfica (Figura IV.10), o padrão interno foi substituído pela norfloxacin (NOR).



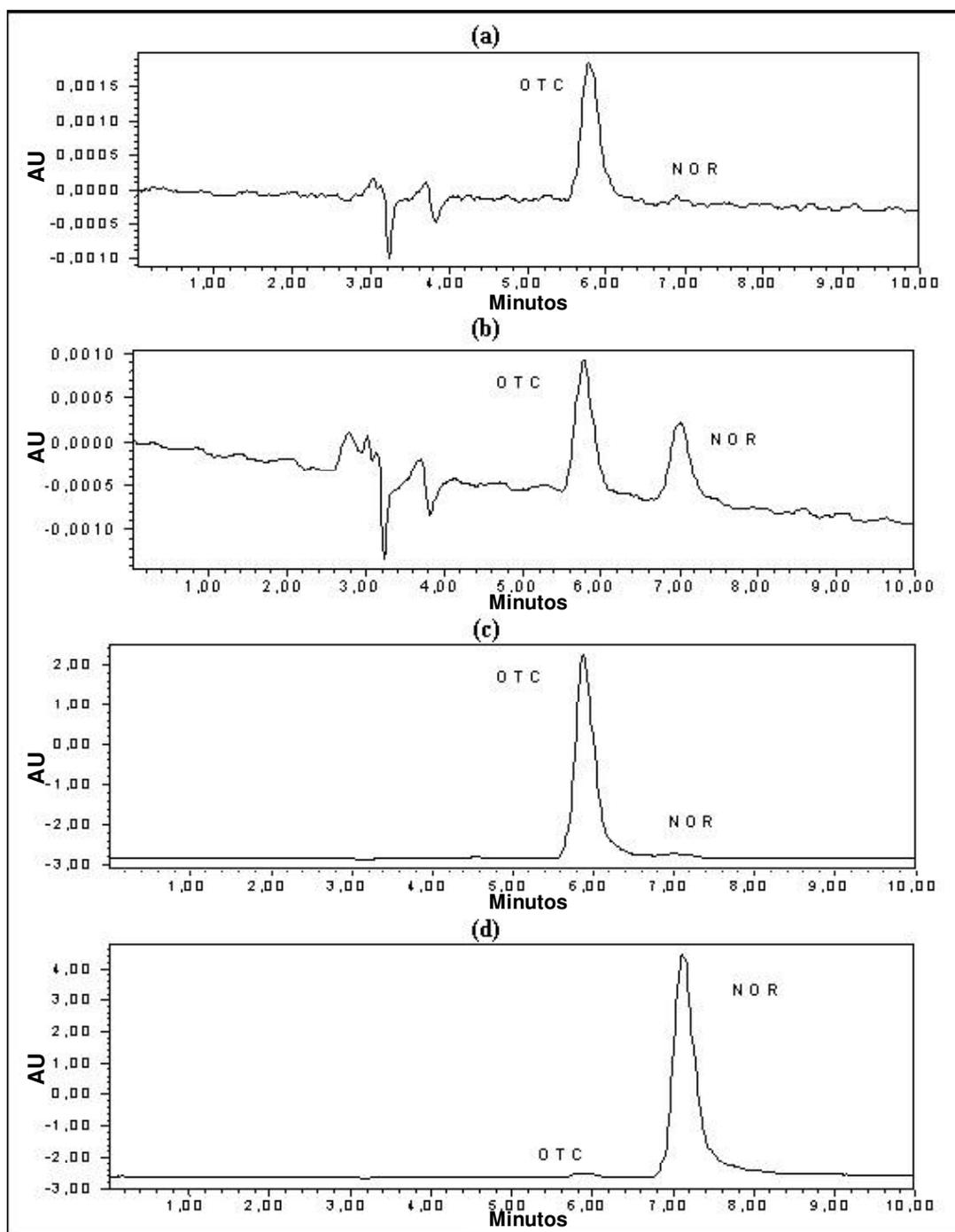
**Figura IV.10** - Cromatograma obtido da amostra branco fortificada com OTC e TC, ambas a  $150 \text{ ng g}^{-1}$ . FE: coluna XTerra-A. FM: FA (acetato de sódio  $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ , EDTA  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0) e FO MeOH. Eluição sob vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , por gradiente linear: 82 % de FA e 18 % de FO de 0 a 6 min; gradiente linear para 61 % de FA e 39 % de FO de 6 a 7 min, se mantendo isocrático até 11 min; e voltando a condição inicial de 11 a 12 min. Detecção por fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ : 380/512 nm).

Tendo como base os resultados obtidos no cromatograma da Figura IV.10, foram realizados diversos testes para promover a separação de TC (padrão interno) do interferente adjacente por alterações no gradiente de eluição. Para separar a TC do interfereinte foi necessário diminuir a força do eluente mediante aumento da proporção da fase aquosa na fase móvel para que TC ficasse mais tempo retida na coluna. No entanto, nessas condições, o tempo de corrida passou a ser muito longo, comprometendo o método. Mesmo inserindo algumas modificações no preparo de amostra que levassem a uma limpeza mais eficiente não resultou em uma redução dos interferentes. Uma vez que a seletividade estava comprometida apenas quanto à separação do padrão interno, foi avaliada a troca da TC por norfloxacina (NOR).

A NOR foi escolhida por também se tratar de um antimicrobiano, com características analíticas previamente estudadas quando do estabelecimento do

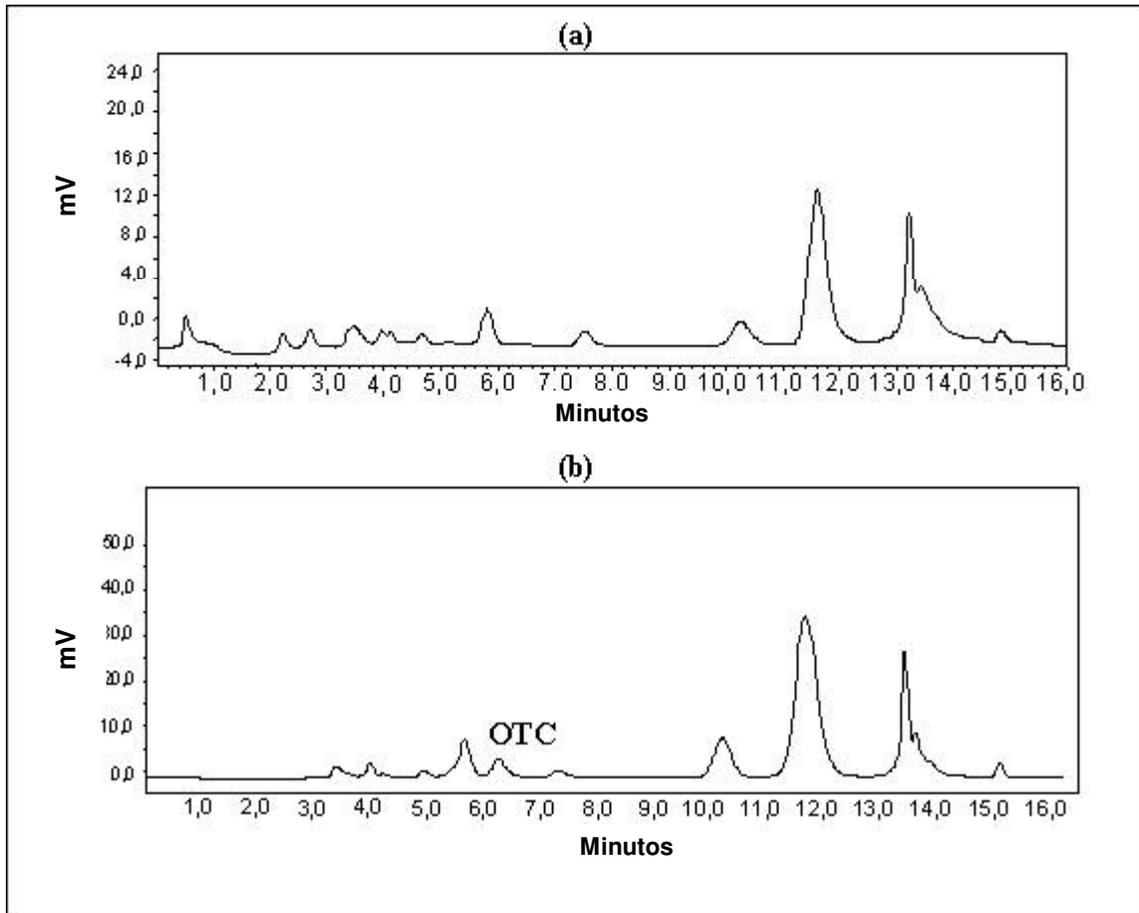
método de determinação das quinolonas (capítulo III), e por não ser de uso indicado para a medicina veterinária, de modo que, numa eventual reprodução desse método para a determinação de OTC em carne de peixe de origem desconhecida, haveria uma menor chance daquela substância estar presente na amostra.

Diferentemente do empregado por MAMANI (2007), o sistema de detecção empregado foi o de fluorescência por ser mostrar mais sensível que o detector DAD, como pode ser verificado pela Figura IV.11.

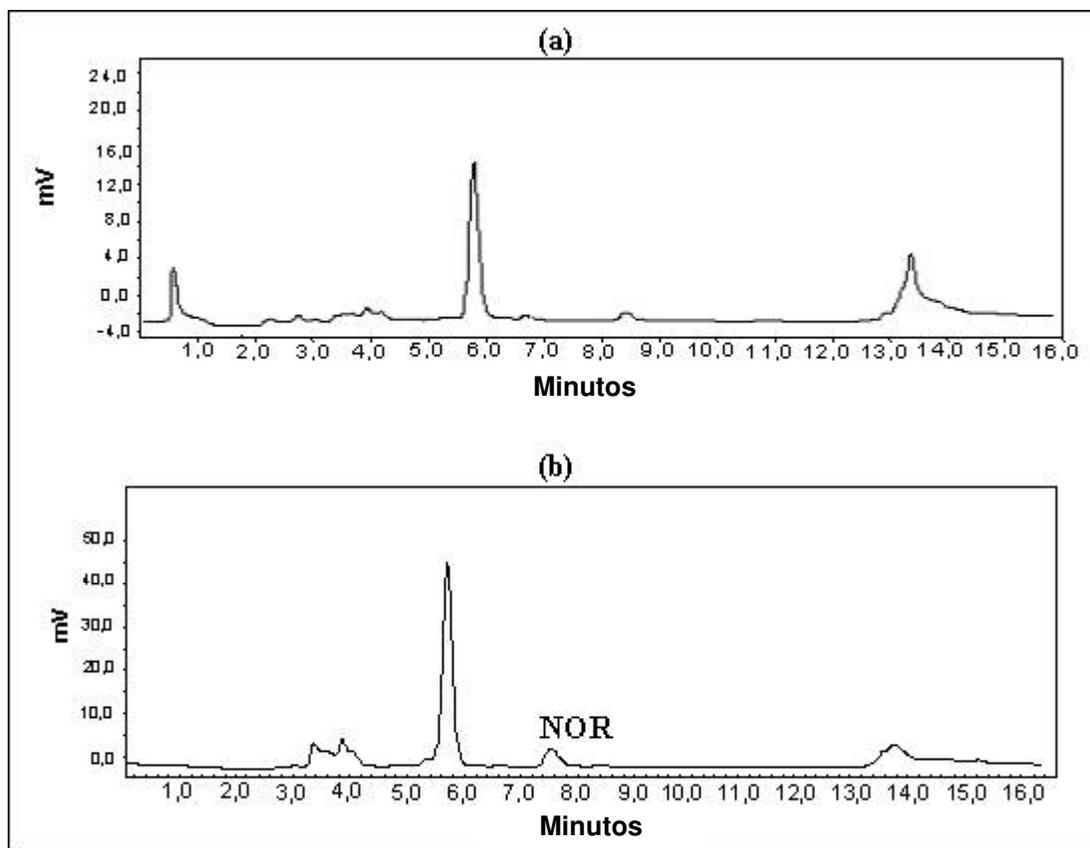


**Figura IV.11** - Comparação de cromatogramas obtidos da separação de OTC e NOR diluídas em solução aquosa ( $150$  e  $25$   $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente), sob detecção por (a e b) DAD (OTC:  $380$  nm; e NOR:  $270$  nm) e (c e d) fluorescência (OTC $_{\lambda_{exc}/\lambda_{em}}$ :  $380/512$  nm; e NOR $_{\lambda_{exc}/\lambda_{em}}$ :  $280/450$  nm). FE: coluna XTerra-A. FM: FA (acetato de sódio  $0,0375$   $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,0175$   $\text{mol L}^{-1}$ , EDTA  $0,0125$   $\text{mol L}^{-1}$ , pH  $7,0$ ) e FO MeOH. Eluição sob vazão de  $1$   $\text{mL min}^{-1}$ , por gradiente linear:  $82$  % de FA e  $18$  % de FO de  $0$  a  $9$  min; gradiente linear para  $50$  % de FA e  $50$  % de FO de  $9$  a  $10$  min, se mantendo isocrático até  $14$  min.; e voltando a condição inicial de  $14$  a  $15$  min.

As Figuras IV.12 e IV.13 apresentam os cromatogramas característicos obtidos de amostra branco de carne de tilápia, e de amostra branco fortificada com OTC e NOR nas concentrações de 150 e 25 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os cromatogramas da Figura IV.12 foram monitorados por fluorescência nas condições de 380/512 nm ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ ), adequadas para a detecção da OTC. Os cromatogramas da Figura IV.13 foram monitorados também por fluorescência, porém nas condições mais adequadas para a detecção da NOR ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ : 280/450 nm). Os cromatogramas foram obtidos usando um gradiente linear de eluição, na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, com a seguinte programação: 82 % de FA e 18 % de FO de 0 a 9 min; gradiente para 50 % de FA e 50 % de FO de 9 a 10 min, se mantendo isocrático até 14 min.; e voltando a condição inicial de 14 a 15 min. Como pode ser observado, um início de eluição com fase móvel mais fraca, isto é, com maior proporção de fase aquosa em relação à fase orgânica, foi necessária para a separação de OTC dos interferentes da matriz e da NOR. Após o tempo de retenção da NOR, pôde-se aumentar a força da fase móvel para acelerar a eluição dos interferentes da matriz, objetivando diminuir a corrida cromatográfica o quanto possível.



**Figura IV.12** - Cromatogramas característicos obtidos (a) da amostra branco de carne de tilápia, e (b) da amostra branco fortificada com OTC ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ) e NOR ( $25 \text{ ng g}^{-1}$ ) com detecção por fluorescência em 380/512 nm ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ). FE: coluna XTerra-A. FM: FA (acetato de sódio  $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ , EDTA  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0) e FO MeOH. Eluição sob vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , por gradiente linear: 82 % de FA e 18 % de FO de 0 a 6 min; gradiente linear para 61 % de FA e 39 % de FO de 6 a 7 min, se mantendo isocrático até 11 min.; e voltando a condição inicial de 11 a 12 min.



**Figura IV.13** - Cromatogramas característicos obtidos (a) da amostra branco de carne de tilápia, e (b) da amostra branco fortificada com OTC ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ) e NOR ( $25 \text{ ng g}^{-1}$ ) com detecção por fluorescência em 280/480 nm ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ ). FE: coluna XTerra-A. FM: FA (acetato de sódio  $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,0175 \text{ mol L}^{-1}$ , EDTA  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0) e FO MeOH. Eluição sob vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , por gradiente linear: 82 % de FA e 18 % de FO de 0 a 6 min; gradiente linear para 61 % de FA e 39 % de FO de 6 a 7 min, se mantendo isocrático até 11 min.; e voltando a condição inicial de 11 a 12 min.

As Figuras IV.12 e IV.13 comprovam a seletividade do método, de modo que se pode averiguar a inexistência de interferentes da amostras (amostra branco) que possam coeluir com o analito (Figura IV.12) ou o padrão interno (Figura IV.13), o que poderia comprometer a identificação e/ou quantificação da OTC.

Com relação à obtenção dos parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico (Tabela IV.8), que são os aqueles que permitem a avaliação da qualidade de separação dos analitos, como  $\alpha$  e  $R_s$ , os valores para um

determinado pico cromatográfico foram obtidos em relação ao pico adjacente de tempo de retenção maior. Como a corrida cromatográfica de separação de OTC e NOR ocorreu sob detecção de fluorescência em dois canais diferentes ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ : 380/512 nm e 280/450 nm, respectivamente), a obtenção e avaliação dos parâmetros cromatográficos foram feitas para os cromatogramas isolados, conforme apresentados nas Figura IV.12 (b) e IV.13 (b), de forma a se avaliar a qualidade da separação entre os analitos detectados na sua melhor condição de fluorescência.

**Tabela IV.8** - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.

<b>Analitos</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>F<sub>s</sub></b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>k</b>	<b>N</b>
<b>OTC</b>	6,27	1,34	1,14	1,17	1,31	3493
<b>NOR</b>	7,49	2,21	1,34	1,23	1,73	3074

Os valores para os parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela IV.8 foram obtidos através do programa *System Suitability* (software Millennium 3.2, Waters, EUA), e os resultados indicam que as condições estabelecidas são consideradas adequadas para os objetivos a que se propõe o método conforme previamente preconizado ( $1 < k < 10$ ;  $\alpha > 1,1$ ;  $R_s > 1,25$ ;  $N > 2000$ ).

#### **IV.5.2.2. Preparo da amostra de carne de peixe**

De um modo geral, os antimicrobianos do grupo das tetraciclina têm propriedades físico-químicas e químicas similares. Devido ao fato de as tetraciclina formarem complexos quelatos com íons metálicos e se ligarem a proteínas, alguns autores consideraram que agentes desproinizantes ácidos são adequados para extrair tetraciclina de amostras biológicas (BLANCHFLOWER *et al*, 1997; WEIMANN & BOJESEN, 1999). No entanto, as tetraciclina reconhecidamente sofrem decomposição em pH baixo (pH < 2,0) (OKA *et al*, 2000). Disto, a grande maioria dos trabalhos citados na literatura tem feito uso de

solventes de moderada acidez contendo EDTA (tampão Mcllvaine a pH 4,0, contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de EDTA).

O preparo de amostras de alimento como carne para posterior análise por HPLC é normalmente composto por duas etapas. Uma envolvendo a homogeneização da matriz com uma solução contendo algum agente precipitante das proteínas, como um ácido, por exemplo, e outra envolvendo a técnica de extração em fase sólida como limpeza do extrato.

O desenvolvimento do método de extração da OTC da carne de tilápia envolveu duas etapas básicas seqüenciais: extração sólido-líquido (LSE) e limpeza do extrato por extração em fase sólida (SPE).

A maioria dos procedimentos descritos na literatura para a extração de OTC de carne de peixe emprega, na etapa de LSE, solução tampão Mcllvaine (pH 4,0) contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de EDTA e solução de ácido tricloroacético (ATCA) (CAMPBELL *et al*, 2001; CASTELLARI, 2003; COYNE *et al*, 2004; WANG *et al*, 2004; RIGOS *et al*, 2006). A maioria desses trabalhos, com exceção do COYNE *et al* (2004), também aliam ao procedimento, uma etapa complementar envolvendo SPE para limpeza do extrato obtido de LSE, empregando cartuchos da fase reversa.

Da experiência adquirida com o desenvolvimento do método para a determinação de quinolonas em carne de peixe (item III.5.1.2, p.64), partiu-se de uma quantidade de 2 g de amostra, e para a etapa de SPE, o cartucho de fase reversa usado foi o HLB-OASIS (500 mg, 6 mL).

O primeiro teste de LSE foi tentar homogeneizar 2 g da carne de peixe com 15 mL de solução tampão Mcllvaine-EDTA (pH 4,0), mas a centrifugação empregada (980 g, 20 min) não foi suficiente para separar as proteínas, e a seqüência com a etapa SPE ficou comprometida por entupimento dos cartuchos. Talvez uma centrifugação com uma força g maior, conforme apontado na literatura por COYNE *et al*, 2001 (16000 g), poderia viabilizar essa condição, mas por não haver a disponibilidade de uma centrífuga com capacidade compatível, optou-se por testar outras alternativas como a composição da solução de extração.

Da experiência adquirida com o desenvolvimento do método para a determinação de quinolonas em carne de peixe (item III.5.1.2, p.64), tem-se que o uso de solução de ATCA é eficaz para precipitar proteínas. No entanto, sua adição ao procedimento pode comprometer a capacidade tamponante da solução tampão Macllvaine (pH 4,0). Sendo assim, optou-se por iniciar o procedimento LSE com uma solução de ATCA a ser adicionada a 2 g de carne de tilápia para promover a precipitação das proteínas. O precipitado foi ressuspendido em um volume adicional de tampão Macllvaine-EDTA (pH 4,0), e o procedimento de homogeneização e centrifugação foi repetido. Ambos os sobrenadantes obtidos foram combinados, o pH corrigido para próximo de 4,0 com a adição de solução de NaOH, e esse extrato foi então encaminhado ao procedimento de limpeza por SPE.

Optou-se por uma solução 5 % de ATCA, por ser menos concentrada do que a usada no procedimento das quinolonas. Não houve adição de modificador orgânico na solução de extração, conforme aplicado para as quinolonas, devido à característica de menor apolaridade da OTC.

A adição de NaOH foi necessária para garantir que o pH final do extrato se situasse em torno de 4,0. Ficou estabelecido que um volume de 350  $\mu\text{L}$  de NaOH 5 mol  $\text{L}^{-1}$  é suficiente para esse propósito.

O procedimento SPE foi desenvolvido com as seguintes etapas: condicionamento com 5 mL de MeOH e 5 mL de água; aplicação do extrato obtido da LSE; e lavagem do extrato com 10 mL de água. A etapa de eluição de OTC do cartucho foi selecionada a partir da literatura (CAMPBELL *et al*, 2001; e CASTELLARI, 2003): percolação no cartucho de 5 mL de solução de MeOH contendo 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  de ácido oxálico.

Os resultados de eficiência de extração obtidos tanto para a OTC como para o padrão interno (NOR), para o nível de concentração avaliado, foram adequados à proposta do método: 61 % e 51 %, respectivamente.

### **IV.5.2.3. Validação da método analítico**

Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) usados para avaliar o método de separação desenvolvido no presente trabalho são: seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

#### **IV.5.2.3.1. Seletividade**

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos para a amostra branco de carne de peixe e para amostra fortificada com a OTC e o padrão interno (NOR), nas concentrações de 150 e 25 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, submetidas ao processo de extração descrito na Figura IV.5 (p.115), com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem comprometer a determinação de cada um dos antimicrobianos.

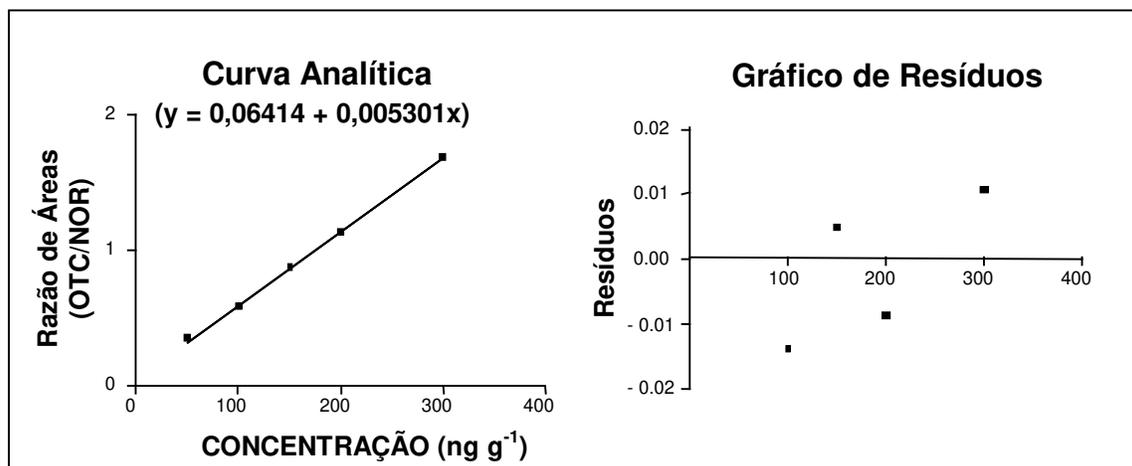
Como critério de aceitação foi estabelecido que as repostas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos deveriam ser inferiores a 20 % das repostas dos respectivos limites de quantificação.

Os resultados são apresentados pelas Figuras IV.12 e IV.13 (p.132-133), onde se pode comprovar a seletividade do método desenvolvido.

#### **IV.5.2.3.2. Curva analítica, linearidade e sensibilidade**

A curva analítica foi construída mediante fortificação de amostras branco de tilápias do grupo controle, em cinco níveis de fortificação (50, 100, 150, 200 e 300 ng g<sup>-1</sup>), estabelecendo a concentração correspondente ao LMR para OTC (100 ng g<sup>-1</sup>) como o segundo nível da curva, e usando a NOR (25 ng g<sup>-1</sup>) como padrão interno. Para a fortificação das amostras branco foram empregadas soluções estoques dos analitos, diluídas em solução aquosa contendo acetato de sódio (0,0375 mol L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,0175 mol L<sup>-1</sup>) e EDTA (0,0125 mol L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para 7,0.

A curva analítica obtida (expressa pela equação  $y = 0,06414 + 0,005301x$ ) e o respectivo gráfico de resíduos estão apresentados na Figura IV.14.



**Figura IV.14** - Curva analítica para quantificação de OTC em carne de peixe, e o respectivo gráfico de resíduos.

O método desenvolvido para a quantificação de OTC em carne de peixe apresentou linearidade superior a 0,99, adequada para a proposta do método, conforme recomendações ANVISA (2003) e da Comunidade Européia (EC 2002).

Considerando a linearidade e a dispersão dos resíduos dentro de uma variação menor do que 20 % (valor recomendado pela EC, 2002), fica comprovada a adequação do método desenvolvido para a faixa linear de trabalho de 14 a 300 ng OTC g<sup>-1</sup>.

#### IV.5.2.3.3. Limite de Detecção (LOD)

Existem diferentes procedimentos para se estimar o LOD, entre esses o da razão sinal-ruído (3:1 para o sinal e ruído da linha de base) (ICH, 1996), o qual foi empregado no presente trabalho, onde se teve como resultado o valor médio das replicatas correspondente a 4,0 ng g<sup>-1</sup>.

#### IV.5.2.3.4. Limite de Quantificação (LOQ)

Para o presente trabalho, o LOQ foi obtido de maneira semelhante ao ocorrido para LOD, isto é, empregado a razão sinal-ruído igual a 10, onde se teve o resultado de  $13,0 \text{ ng g}^{-1}$ , apresentado como valor médio das replicatas.

É importante ressaltar para que o método seja aceitável para a determinação de resíduo de medicamentos veterinários em alimentos, o LOQ deve ser menor do que o LMR estabelecido para o analito (contaminante) em questão, o que veio a se confirmar (LMR da OTC em carne de peixe é de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ).

#### IV.5.2.3.5. Precisão

Para avaliar a precisão do método desenvolvido, o procedimento ocorreu da seguinte forma:

Precisão intra-ensaio: foi obtida para um nível de concentração ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, analisada em quintuplicata ( $n = 5$ ) em um mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento e o resultado, expressa como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD), foi de 6,2 %.

Precisão inter-ensaio: foi obtida para três níveis de concentração (100, 150 e  $200 \text{ ng g}^{-1}$ ), mediante fortificação de amostras branco, em três dias diferentes ( $n = 3$ ). As análises foram realizadas pelo mesmo analista e no mesmo equipamento e o resultado, expresso como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD), foi de 1,5 % ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ); 10,3 % ( $150 \text{ ng g}^{-1}$ ); e 6,2 % ( $200 \text{ ng g}^{-1}$ ).

A precisão intra e inter-ensaios foi inferior a 20 %, conforme recomendado pela EC (2002).

#### IV.5.2.3.6. Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada mediante teste de recuperação, com amostras branco de carne de tilápia fortificadas com OTC ( $150$

ng g<sup>-1</sup>) e NOR (25 ng g<sup>-1</sup>), repetidas em dias diferentes (n = 3). Os resultados obtidos, transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos após desenvolvimento do procedimento de extração, variaram na faixa de 86 a 97 % e estão dentro das recomendações da EC (2002) (80 - 110 %).

A Tabela IV.9 sumariza os resultados obtidos dos parâmetros de validação para o método desenvolvido para a determinação de OTC em carne de peixe.

**Tabela IV.9** - Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para determinação de OTC em carne de tilápia por HPLC-FL.

<b>Parâmetros</b>	<b>OTC</b>
<b>Faixa linear (ng g<sup>-1</sup>)</b>	13-300
<b>Linearidade</b>	0,9968
<b>Sensibilidade (ua g ng<sup>-1</sup>)</b>	0,00530
<b>Intra-Ensaio (RSD %)</b>	
<b>150 ng g<sup>-1</sup> (n = 3)</b>	6,2
<b>Inter-Ensaio (RSD %)</b>	
<b>Precisão</b>	
<b>100 ng g<sup>-1</sup> (n = 5)</b>	1,5
<b>150 ng g<sup>-1</sup> (n = 5)</b>	10,3
<b>200 ng g<sup>-1</sup> (n = 5)</b>	6,2
<b>LOD (ng g<sup>-1</sup>) (n = 3)</b>	4,0
<b>LOQ (ng g<sup>-1</sup>) (n = 3)</b>	13
<b>Exatidão (% Recuperação)</b>	
<b>150 ng g<sup>-1</sup> (n = 3)</b>	86-97

Os resultados da Tabela IV.9 se apresentaram satisfatórios ao que se propõe o método desenvolvido, ou seja, quantificação de OTC na carne de peixe, e portanto, o método pode ser aplicado no estudo de depleção de resíduos de OTC na carne de tilápias.

### ***IV.5.3. Resultados de depleção de OTC na carne de tilápias***

A OECD (OECD, 1996) apresenta uma norma de procedimento para avaliação da bioconcentração de substâncias químicas em peixes na qual recomenda um número mínimo de quatro indivíduos por tratamento (diferentes concentrações testes da substância avaliada). Para o mesmo objetivo, a agência U.S.FDA (FDA, 2006) recomenda o uso de cinco indivíduos por tratamento. No presente estudo, para avaliar a depleção de OTC na tilápia e estabelecer o período de carência, grupos de peixes com dez indivíduos, com peso individual médio de cerca de 100 g, foram abatidos após 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20 e 25 dias da exposição a OTC.

#### ***IV.5.3.1. Análises das amostras das tilápias do ensaio***

Para cada um dos dias selecionados para avaliação de resíduos de OTC, foram analisadas amostras de dez peixes em duplicata. As análises foram realizadas conforme método desenvolvido neste trabalho (item IV.5.2, p.126). Os resultados das médias das duplicatas estão compilados na Tabela IV.10.

Os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e concentração amoniacal) da água dos tanques, que comportaram os peixes do ensaio, foram monitorados durante o período de estudo, conforme apresentado na Tabela IV.4 (p.107).

**Tabela IV.10.** Dados de concentração média de OTC obtidas das análises em duplicatas nas carnes das tilápias do ensaio.

	PEIXES	Conc. OTC (ng g <sup>-1</sup> )	PEIXES	Conc. OTC (ng g <sup>-1</sup> )	PEIXES	Conc. OTC (ng g <sup>-1</sup> )		
<b>GAIOLA – 1 (DIA 1)</b>	1.1	68	<b>GAIOLA – 2 (DIA 2)</b>	2.1	52	<b>GAIOLA – 3 (DIA 3)</b>	3.1	70
	1.2	82		2.2	78		3.2	30
	1.3	227		2.3	154		3.3	46
	1.4	171		2.4	53		3.4	47
	1.5	105		2.5	26		3.5	84
	1.6	160		2.6	103		3.6	45
	1.7	114		2.7	85		3.7	46
	1.8	169		2.8	111		3.8	37
	1.9	77		2.9	98		3.9	56
	1.10	104		2.10	84		3.10	51
<b>GAIOLA – 4 (DIA 4)</b>	4.1	35	<b>GAIOLA – 5 (DIA 5)</b>	5.1	<LOQ	<b>GAIOLA – 6 (DIA 8)</b>	6.1	23
	4.2	43		5.2	31		6.2	21
	4.3	64		5.3	30		6.3	20
	4.4	86		5.4	19		6.4	<LOD
	4.5	70		5.5	36		6.5	<LOQ
	4.6	24		5.6	<LOD		6.6	<LOD
	4.7	15		5.7	<LOD		6.7	<LOD
	4.8	26		5.8	<LOQ		6.8	<LOD
	4.9	74		5.9	<LOD		6.9	<LOQ
	4.10	55		5.10	<LOD		6.10	<LOD
<b>GAIOLA – 7 (DIA 10)</b>	7.1	<LOD						
	7.2	<LOD						
	7.3	<LOD						
	7.4	<LOQ						
	7.5	<LOQ						
	7.6	<LOD						
	7.7	<LOD						
	7.8	<LOD						
	7.9	<LOD						
	7.10	<LOD						

Na Tabela IV.10 pode-se verificar que alguns peixes da gaiola 6, e quase todos os peixes da gaiola 7, representando, respectivamente, os períodos de 8 e 10 dias após a medicação dos animais, apresentaram concentrações de OTC na carne abaixo do LOD (4 ng g<sup>-1</sup>) do método analítico.

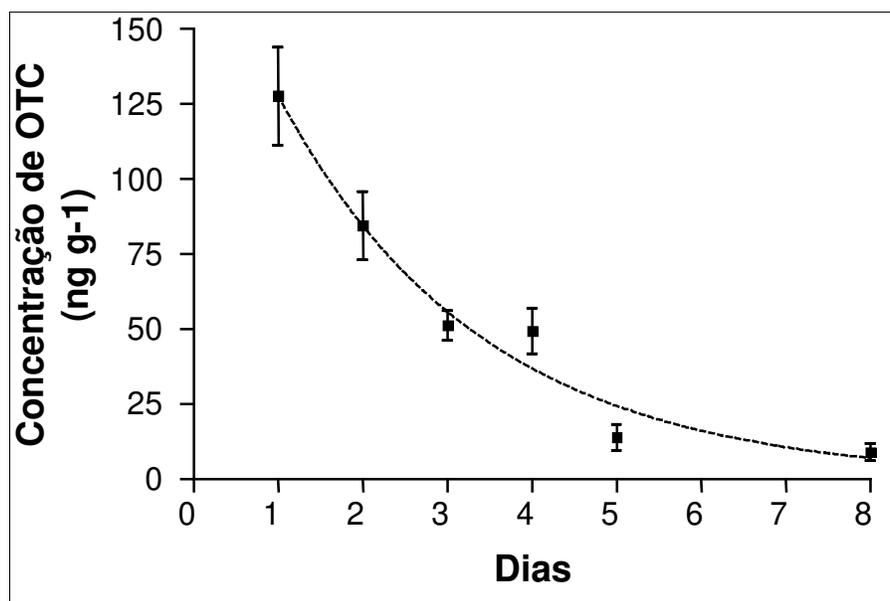
#### IV.5.3.2. Avaliação da depleção de OTC na carne de tilápias

As concentrações médias de OTC nos diferentes dias após a medicação e as respectivas estimativas dos desvios padrão relativos e intervalos de confiança ( $P < 0,05$ ) estão apresentados na Tabela IV.11. Os resultados apresentados na Tabela IV.11 foram obtidos a partir dos dados da Tabela IV.10. Para as concentrações de OTC abaixo do LOQ ou LOD foram atribuídos valores de 8 e 2  $\text{ng g}^{-1}$ , respectivamente, conforme recomendação da EMEA, que correspondem a metade dos respectivos limites estabelecidos no método analítico.

**Tabela IV.11.** Concentração de OTC na carne de tilápia alimentadas com ração medicada com OTC (80 mg de OTC/kg PV/dia) durante 5 dias. (t: tempo de depleção).

Gaiola	t (dias)	n	Concentração		Intervalo da concentração de OTC ( $\text{ng g}^{-1}$ ) ( $P < 0,05$ )
			média de OTC ( $\text{ng g}^{-1}$ )	RSD (%)	
1	1	10	128	40	91 – 165
2	2	10	84	43	59 – 110
3	3	10	51	31	40 – 62
4	4	10	49	49	32 – 67
5	5	10	14	14	< LOQ – 24
6	8	10	< LOQ	9	< LOD – 15

A curva de depleção da OTC da carne de tilápias após o término do tratamento de medicação é apresentada na Figura IV.15.



**Figura IV.15.** Perfil da curva concentração de OTC em função do tempo (período entre a última administração de OTC e o abate). Os intervalos em cada tempo representam o valor médio  $\pm$  estimativa do desvio padrão. A curva tracejada apenas mostra a tendência.

Mediante o emprego do programa computacional GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 2.1 (1996), foi obtida a equação que melhor se ajusta ao perfil de depleção descrito, que é uma equação exponencial de primeira ordem (Equação IV.1):

$$C = A_1 \exp(-\beta t) \quad (\text{IV.1})$$

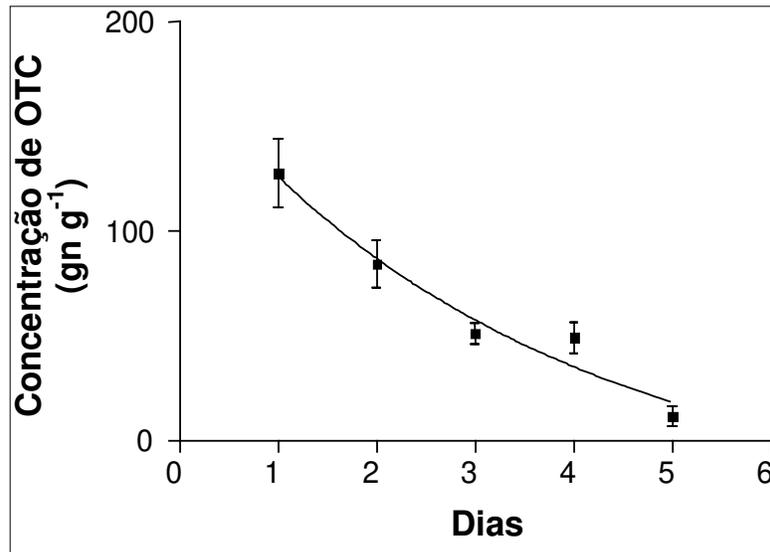
onde: C é a concentração de OTC na carne de peixe após o dia t (período após última medicação) e  $\beta$  a constante de eliminação da fase terminal.

É importante destacar, que após 5 dias a concentração de OTC na carne dos peixes avaliados situava-se abaixo do LOQ e, portanto, esses pontos não foram considerados para gerar o modelo matemático.

Substituindo os valores calculados pelo programa matemático temos a equação IV.2:

$$C = 214,4 \exp(-0,279 t) - 34,09 \quad (\text{IV.2})$$

Os parâmetros do modelo foram ajustados usando a regressão não linear por mínimos quadrados, onde foi obtido um  $r^2$  de 0,9962. O gráfico está apresentado na Figura IV.16.



**Figura IV.16.** Curva concentração de OTC em função do tempo (período entre a última administração de OTC e o abate). Os intervalos em cada tempo representam o valor médio  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

O tempo de meia-vida de eliminação da OTC na carne de peixe é de 2,5 dias, obtido a partir da seguinte relação (equação IV.3):

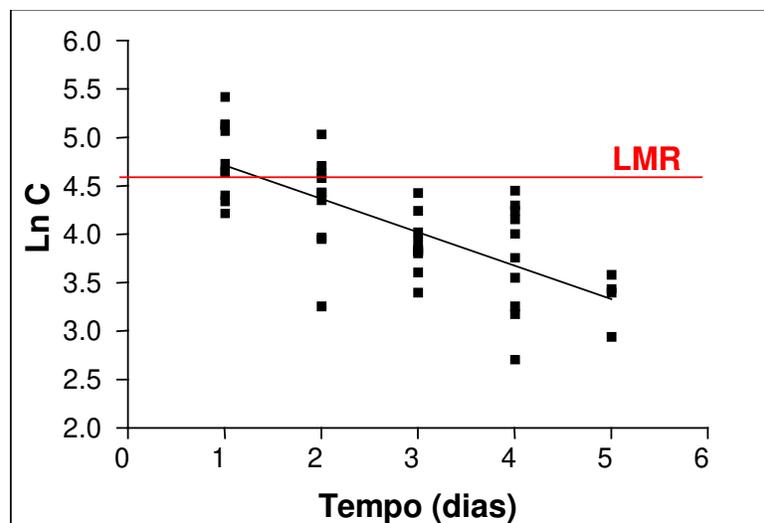
$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\beta} \quad (3)$$

O período de carência é determinado quando o limite de tolerância da concentração residual se encontra abaixo do valor de LMR. O limite de tolerância fornece um intervalo na qual se localiza um percentil da população com um nível de confiança. A FDA recomenda empregar 99 % de percentil e 95 % de confiança para essa avaliação. Para estabelecer o período de carência, a FDA recomenda modelar a curva de depleção no sentido de gerar uma reta, ou seja, transformar a concentração em sua função logarítmica. Para empregar esse modelo é

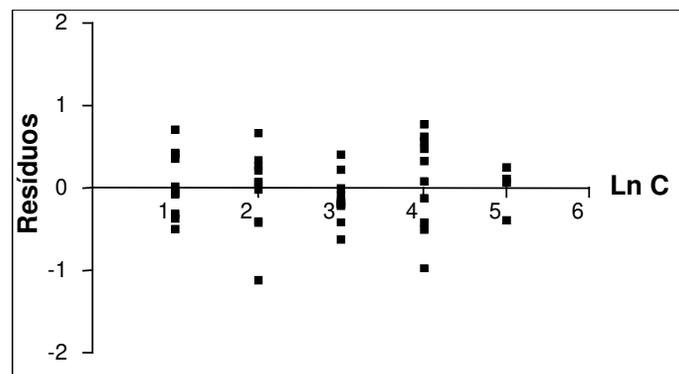
necessário verificar se a incerteza da variável dependente realmente segue uma distribuição de Gauss após transformação logarítmica, o que requer que a concentração residual, em cada tempo avaliado, siga uma distribuição log-normal. O teste recomendado para essa finalidade é o teste de Bartlett (CONCORDET & TOUTAIN, 1997). Os resultados obtidos experimentalmente após linearização do modelo (Figuras IV.17 e IV.18) confirmam a distribuição log-normal.

A equação IV.4 descreve o modelo matemático:

$$\text{Ln } C = -0,4824 (\pm 0,0495) t + 5,248 (\pm 0,220) \quad (\text{IV.4})$$



**Figura IV.17** - Linearização da curva de depleção (ln C vs tempo). Em vermelho está representado o LMR.



**Figura IV.18** - Gráfico de resíduos.

A partir do gráfico da Figura IV.17 pode-se verificar que a concentração de OTC na carne das tilápias atinge níveis abaixo do limite máximo de resíduo ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ) a partir do quinto dia depois de finalizada a medicação.

Os resultados obtidos indicam um período de carência de 5 dias quando as tilápias são submetidas a uma medicação a base de OTC via ração (80 mg por kg de PV por dia) durante cinco dias consecutivos, nas condições ambientais empregadas no estudo.

Os trabalhos reportados na literatura apontam para comportamentos distintos de depleção de OTC em função de diferentes variáveis, como espécies de peixes, via de fornecimento da medicação, assim como condições ambientais (temperatura da água, pH, e outros).

MEINERTZ *et al* (2001) avaliaram a depleção de OTC na carne de salmão, após uma medicação de 10 dias consecutivos, via ração, na concentração de  $88,2 \text{ mg}(\text{kg PV})^{-1}(\text{dia})^{-1}$ , e determinaram um tempo de meia vida de eliminação de 4,9 dias. A temperatura da água variou na faixa de 4 a  $8,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatura.

BJÖRKLUND & BYLUND (1990), usando trutas arco-íris (*rainbow trout*), com medicação por 10 dias consecutivos, via ração, na concentração de  $100 \text{ mg}(\text{kg PV})^{-1}(\text{dia})^{-1}$ , determinaram um tempo de meia vida de eliminação de 1,7 dias (temperatura da água variou de 17 a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Quando o ensaio foi realizado a  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , com a mesma espécie de peixe, no entanto com fornecimento oral do medicamento na concentração de  $75 \text{ mg OTC}(\text{kgPV})^{-1}$ , em dose única, o tempo de meia vida de eliminação foi de 5,9 dias.

Os resultados de depleção de OTC encontrados no presente trabalho, para as tilápias do Nilo, relatam um tempo de meia vida de eliminação menor que os da literatura, confirmando o esperado quando se leva em consideração as maiores temperaturas envolvidas neste estudo.

## IV.6. Conclusões

O método desenvolvido usando a cromatografia líquida de alta eficiência associado a detecção por fluorescência é adequado para a determinação de

resíduos de OTC em carne de tilápias, apresentando os parâmetros de validação conforme preconizados pela Comunidade Européia.

O ensaio com as tilápias permitiu estabelecer a curva de depleção de OTC na carne dos peixes, a qual se ajusta a um modelo exponencial de primeira ordem.

Para as tilápias (*Oreochromis niloticus*) mantidas a uma temperatura no intervalo de 16,5 a 24,5 °C e tratadas por cinco dias consecutivos com OTC via ração em uma concentração de  $80 \text{ mg}(\text{kg PV})^{-1}(\text{dia})^{-1}$  o tempo de meia vida de eliminação foi de 2,5 dias. O período de carência estimado foi de 5 dias.

A concentração de OTC na carne das tilápias foi menor do que o LMR com três dias após o término do fornecimento do fármaco via ração.

A variação entre as concentrações de OTC na carne de tilápias de um mesmo grupo (replicatas) foi menor do que 50 % e menor do que reportada por outros autores. Cabe ressaltar que os dados são independentes entre si já que cada replicata se refere a um animal diferente. Portanto, a dispersão dos resultados é função de variáveis como: número de peixes contidos em cada tanque e maneira como é fornecida a ração. Existe uma competição natural pelo alimento entre os indivíduos, o que leva a ingestão diferenciada do fármaco pelos mesmos.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com outros reportados na literatura, embora com espécies diferentes, indicam a necessidade de que estudos visando o estabelecimento de períodos de carência sejam realizados na região de criação dos peixes, uma vez que os parâmetros de depleção não somente dependem da espécie animal, mas também das condições ambientais, em particular a temperatura do meio.

---

---

# **CAPÍTULO V**

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

---

- ANADÓN, A. Les résidus de substances chimiques dans les aliments d'origine animale en Espagne. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, v.63, p.245-252, 1990.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*, v.59, p.183-198, 1999.
- ANDERSON, C.R.; RUPP, H.S.; WU, W.H. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1075, p.23-32, 2005.
- ANUALPEC 2002:Anuário da pecuária brasileira. Instituto FNP. Ed. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo/SP, 400p, 2002.
- ANUALPEC 2005:Anuário da pecuária brasileira. Instituto FNP. Ed. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo/SP, 400p, 2005.
- ANVISA, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE nº 899, de 29/05/2003.
- ANVISA, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: <http://www.anvisa.gov.br>, acessada em Janeiro 2007.
- AUSTIN, B.. The control of bacterial fish diseases by antimicrobial compounds. In: Woodbine, M. (Ed.), *Antimicrobials in Agriculture*. Butterworth, London, pp. 255–268, 1984.
- BAILAC, S.; BALLESTEROS, O.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; BARRÓN, D.; SANZ-NEBOT, V.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J.L.; BARBOSA, J. Determination of quinolones in chicken tissues by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, v.1029, p.145-151, 2004.
- BALL, P. The Quinolones: History and overview. In.: ANDRIOLE, V. *The Quinolones*. 3<sup>th</sup> Edition. Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, U.S.A. 517p. 2000.

- BELLAVER, C. Nutricionista frente à sustentabilidade da produção animal. In: Anais do Simpósio sobre as Implicações Sócio-Econômicas do Uso de Aditivos na Produção Animal. Piracicaba/SP, 1999. p.1-22.
- BERGWERFF, A.A.; SCHERPENISSE, P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. **Journal of Chromatography B**, v.788, p.351-359, 2003.
- BERNARDY, J.A.; VUE, C.; GAIKOWSKI, M.P.; STEHLY, G.R.; GINGERICH, W.H.; MOORE, A. Residue depletion of oxytetracycline from fillet tissues of northern spike and walleye. **Aquaculture**, v.221, p.657-665, 2003.
- BJÖRKLUND, H.; BYLUND, G. Temperature-related absorption and excretion of oxtetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v.84, p.363-372, 1990.
- BLANCHFLOWER, W.J.; McCRACKEN, R.J.; RICE, D.A. Determination of chlortetracycline residues in tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **The Analyst**, v.114, p.421-424, 1989.
- BLANCHFLOWER, W.J.; MCCRACKEN, R.J.; HAGGAN, S.A.; KENNEDY, D.G. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.692, p.351-360, 1997.
- BORGHETTI, J.R. & OSTRENSKY, A. Estratégias e ações governamentais para incentivar o crescimento da atividade aquícola no Brasil. In: I Congresso Sul-Americano de Aqüicultura, X Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, V Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão e II Feira de Tecnologia e Produtos para Aqüicultura. Desenvolvimentos com sustentabilidade. 447 p., 1998.
- BRILLANTES, S.; TANASOMWANG, V.; THONGROD, S.; DACHANANTAWITAYA, N. Oxytetracycline residues in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.4995-4999, 2001.

- BROWN, M.L.; POWELL, J.L.; LUCCHESI, D.O. In-transit oxytetracycline marking, nonlethal mark detection, and tissue residue depletion in yellow perch. **North American Journal of Fisheries Management**, v.22, p.236-242, 2002.
- CARSON, M.C.; NGOH, M.A.; HADLEY, S.W. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.712, p.113-128, 1998.
- CAMPBELL, D.A.; PANTAZIS, P.; KELLY, M.S. Impact and residence time of oxytetracycline in the sea urchin, *Psammechinus miliaris*, a potential aquaculture species. **Aquaculture**, v.202, p.73-87, 2001.
- CASTELLARI, M.; GARCÍA-REGUEIRO, J.A. HPLC determination of tetracyclines in lamb muscle using an RP-C<sub>18</sub> monolithic type column. **Chromatographia**, v.58, p.789-792, 2003.
- CHEN, C.Y.; GETCHELL, G.; WOOSTER, G.A. Oxytetracycline residues in four species of fish after 10-day oral dosing in feed. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.16, p.208-219, 2004.
- CHENG, Y.F.; PHILLIPS, D.J.; NEUE, U. Simple and rugged SPE method for the determination of tetracycline antibiotics in serum by HPLC using a volatile mobile phase. **Chromatographia**, v.44, p.187-190, 1997.
- CHERLET, M.; SCHELKENS, M.; CROUBELS, S.; BACKER, P.D. Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.492, p.199-213, 2003.
- CINQUINA, A.L.; LONGO, F.; ANASTASI, 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**, v.987, p.227-233, 2003.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S.; *Fundamentos de Cromatografia*, Editora UNICAMP; Campinas, SP, 2005.

- CONCORDET, D.; TOUTAIN, P.L. The withdrawal time estimation of veterinary drugs revisited. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.20, p.380-386, 1997.
- COYNE, R.; BERGH, O.; SAMUELSEN, O.B. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. *Journal of Chromatography B*, v.810, p.325-328, 2004.
- EC, 2002. European Commission. *Official Journal of the European Communities*, 17/08/2002, L221/8-36.
- EMA, 2007. European Medicines Agency: <http://www.emea.europa.eu/index/indexv1.htm>, acessada em dezembro de 2007.
- FAO, 1997. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Validation of Analytical Methods for Food Control. December, 1997.*
- FAO/OIE/WHO , 2006. Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Issued by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health. Seoul, Republic of Korea, 13-16 June 2006.
- FDA, 1996. United States Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations (21CFR558), 1996. Oxytetracycline. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., pp. 443– 446. Title 21, Part 558, Section 450.
- FDA, 2001. United States Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May, 2001.
- FDA, 2006. United States Food and Drug Administration. *General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals*. 2006.
- FLOREY, K. United States Food and Drug Administration. *Analytical profiles of drug substances*. Academic Press , New Jersey. V.13, 598p, 1984.
- FURUSAWA, N. Rapid and simple determination of oxytetracycline in chicken products. *Journal of AOAC International*, v.82, p.770-772, 1999.

- HALME, K.; LINDFORDS, E.; PELTONEN, K. Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v.21, p.641-648, 2004.
- HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J.A.; BARBOSA, J.; COMPAÑÓ, R.; PRAT, M.D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. **Journal of Chromatography A**, v.945, p.1-24, 2002<sup>a</sup>.
- HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J.A.; BELTRÁN, J.L.; COMPAÑÓ, R.; PRAT, M.D. Fast-scanning fluorescence spectroscopy as a detection system in liquid chromatography for confirmatory analysis of flumequine and oxolinic acid. **Journal of Chromatography A**, v.942, p.275-281, 2002<sup>b</sup>.
- HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M. SUAREZ-BARCENA, J.M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. **Analytica Chimica Acta**, v.562, p.176-184, 2006.
- ICH, 1996. International Conference on Harmonization. *Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4*, Consensus Guideline, 6 November 1996.
- ICH, 2007. International Conference on Harmonization: <http://www.ich.org/>, acessada em Janeiro 2007.
- INMETRO, 2003. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- INMETRO, 2007. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial: <http://www.inmetro.gov.br>, acessada em Janeiro de 2007.
- ISO, 1999. International Organization in Standardization. *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/EC 17025, 1999.
- IUPAC, 2007. International Union of Pure and Applied Chemistry: <http://goldbook.iupac.org/R05305.html>, acessada em Janeiro 2007.

- IWAKI, K.; OKUMURA, N.; YAMAZAKI, M. Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v.623, p.153-158, 1992.
- JECFA, 2007. Joint Expert Committee on Food Additives: <http://jecfa.ilsa.org/section1.htm#1>, acessada em Abril 2007.
- JOHNSTON, L.; MACKAY, L.; CROFT, M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.982, p.97-109, 2002.
- KARUNASAGAR, I., PAI, R., MALATHI, G.R. AND KARUNASAGAR, I. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**, v.128, p.203-209, 1994.
- KATZUNG, B.G., Farmacologia Básica e Clínica, 6ª edição, Rio de Janeiro/RJ: Guanabara. 1995.
- KERRY, J.; HINEY, M.; COYNE, R.; NICGABHAINN, S.; GILROY, D.; CAZABON, D.; SMITH, P. Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under farms. **Aquaculture**, v.131, p.101-113, 1995.
- KIM, H.S.; LEE, D.W. Retention behavior of quinolones in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.722, p.69-79, 1996.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção e comercialização. Editora *Acqua & Imagem*. Jundiaí, SP. 287 p., 2000.
- KULSHRESTHA, P.; GIESE, R.F.; AGA, D.S. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil. **Environmental Science and Technology**, v.38, p.4097-4105, 2004.
- LESHER, G.Y.; FROELICH, E.D.; GRUET, M.D. 1,8 naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of Medical Pharmacological Chemistry**, v.5, p.1063-1068, 1962.

- MAMANI, M.C.V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Tese de doutorado, UNICAMP. Campinas/SP, 201p, 2007.
- MEINERTZ, J.R.; STEHLY, G.R.; GINGERICH, W.H. Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish. ***Journal of AOAC International***, v.81, p.702-708, 1998.
- MEINERTZ, J.R.; GAIKOWSKI, M.P.; STEHLY, G.R.; GINGERICH, W.H.; EVERED, J.A. Oxytetracycline depletion from skin-on fillet tissue of coho salmon fed oxytetracycline medicated feed in freshwater at temperatures less than 9 °C. ***Aquaculture***, v.198, p.29-39, 2001.
- MERÁS, I.D.; DÍAZ, T.G.; LÓPEZ, F.S.; CACÉRES, M.I.R. Determination of piromidic acid residues in trout muscle tissue and in urine by liquid chromatography with post-column modification of pH and fluorimetric detection. ***Journal of Chromatography B***, v.718, p.135-141, 1998.
- MILLER J. C.; MILLER J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood; New York, 1993.
- MITSCHER, L.A (Ed.). The chemistry of the tetracycline antibiotics, 1<sup>st</sup> Edition, Marcel Dekker, New York, p.91, 1978.
- NAMDARI, R.; ABEDINI, S.; LAW, F.C.P. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. ***Aquaculture***, v.144, p.27-38, 1996.
- OECD, 1996. Organization for Economic Co-operation and Development. *Guidelines for testing of chemicals. Proposal for updating guideline 305 – Bioconcentration: Flow-through fish test*. 1996.
- OKA, H.; IKAI, Y.; HAYAKAWA, J.; MASUDA, K.; HARADA, K.I.; SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XIX: Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. ***Journal of AOAC International***, v.77, p.891-895, 1994.

- OKA, H.; ITO, .; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. ***Journal of Chromatography A***, v.882, p.109-133, 2000.
- OWEN, D.B. A survey of properties and applications of the non-central t-distribution, ***Technometrics*** v.10, p.445-478,1968.
- PENA, A.L.; LINO, C.M.; SILVEIRA, M.I.N. Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection. ***Journal of AOAC International***, v.86, p.925-929, 2003.
- RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCIA, E.; REUVERS, T.; HOOGHUIS, H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. ***Journal of Chromatography B***, v. 789, p.373-381, 2003.
- RIGOS, G.; NENGAS, I.; ALEXIS, M. Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). ***Aquaculture***, v.261, p.1151-1155, 2006.
- ROGATSKY, E.; STEIN, S.; Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. ***Journal of American Society for Mass Spectrometry***, v. 16, n.11, p.1757-1759, 2005.
- ROUDAUT, B.; YORKE, J.C. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. ***Journal of Chromatography B***, v.780, p.481-485, 2002.
- RUPP, H.S.; ANDERSON, C.R. Determination of oxytetracycline in salmon by liquid chromatography with metal-chelate fluorescence detection. ***Journal of AOAC International***, v.88, p.505-510, 2005
- SAMUELSEN, O.B.; ERVIK, A.; PURSELL, L.; SMITH, P. Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, and oxolinic acid ester, in Atlantic salmon (*Salmon salar*) held in seawater and in vitro antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*. ***Aquaculture***, v.187, p.213-224, 2000.

- SCHNEIDER, M.J.; DARWISH, A.M.; FREEMAN, D.W. Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle high performance liquid chromatography with fluorescence detection. ***Analytica Chimica Acta***, v.586, p.269-274, 2007.
- SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. ***Journal of Chromatography A***, v.987, p.57-66, 2003.
- SILVA, R.G. Farmacocinética e determinação de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito em tecidos de frangos. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas/SP, 127p, 2004.
- SØRUM, H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In: Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin, F. Aarestrup Ed., ASM Press. Washington DC, USA. 2006.
- STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. ***Journal of Chromatography A***, v.1067, p.15-53, 2005
- SU, S.C.; CHANG, M.H.; CHANG, C.L.; CHANG, P.C.; CHOU, S.S. Simultaneous determination of quinolones in livestock and marine products by high performance liquid chromatography. ***Journal of Food and Drug Analysis***, v.2, p.114-127, 2003.
- TOUSSAINT, B.; CHEDIN, M.; BORDIN, G.; RODRIGUEZ, A.R. Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Laboratory-validated method. ***Journal of Chromatography A***, v. 1088, p.32-39, 2005.
- THOMPSON, M.; STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). ***Pure and Applied Chemistry***, v.74, p.835-855, 2002.

- TYRPENOU, A.E.; RIGOS, G. Determination of oxolinic acid residues in gilthead seabream (*Sparus aurata*) muscle tissue and plasma by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v.60, p.657-661, 2004.
- UENO, R.; SANGRUNGRUANG, K.; MIYAKAWA, M. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 32, p.629-633, 1999.
- VINAS, P.; BALSALOBRE, N.; LOPEZ-ERROZ, C.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. **Journal of Chromatography A**, v.1022, p.125-129, 2004.
- VOLMER, D.A.; MANSOORI, B.; LOCKE, S.J. Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, 69, p.4143-4155, 1997.
- WALSH, J.R.; WALKER, L.V.; WEBBER, J.J. Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v.596, p.211-216, 1992.
- WANG, Q.; LIU, Q.; LI, J. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in perch *Lateolabrus janopicus* and black seabream (*Sparus macrocephalus*) following oral administration. **Aquaculture**, v.237, p.31-40, 2004.
- WEIMANN, A.; BOJESSEN, G. Analysis of tetracyclines in raw urine by column-switching high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 721, p.47-54, 1999.
- WEN, Y.; WANG, Y.; FENG, Y.Q. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.70, p.153-159, 2006.

- WHO, 1998. World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting – Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Geneva, Switzerland, June/1998.
- WHO, 1999. World Health Organization. Food safety issues associated with products from aquaculture. Report of a Joint FAO/NACA/WHO Study Group on Food Safety Issues Associated with Products from Aquaculture. WHO Technical Report Series 883. Geneva, Switzerland, 1999.
- WHO, 2004. World Organisation for Animal Health. Organisation Internationale des Epizooties, World Health Organization, and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004a. Joint FAO/OIE/WHO 1st Expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment. Geneva, Switzerland, 1-5. December 2003. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/report.pdf>
- WHO, 2007. World Organisation for Animal Health: <http://www.who.int/foodsafety/en/>, acessada Março 2007.
- YANG, S.; CHA, J.; CARLSON, K. Simultaneous extraction and análise of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal do Chromatography A**, v.1097, p.40-53, 2005.
- YORKE, J.C.; FROC, P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.63-77, 2000.
- ZHU, J.; SNOW, D.D.; CASSADA, D.A.; MONSON, S.J.; SPALDING, R.F. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.928, p.177-186, 2001.