

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

**OXITETRACICLINA EM TOMATES E  
BACTERICIDAS AGRÍCOLAS E AVALIAÇÃO DOS  
SEUS RESÍDUOS EM TOMATES PRODUZIDOS EM  
ESTUFA E CULTURA DE CAMPO**

Patrícia Penido Maia  
Engenheira de Alimentos  
(Mestre em Microbiologia)

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
(Orientador)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos,  
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do  
título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas - SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA - UNICAMP

Maia, Patrícia Penido

M28o Oxiteraciclina em tomates e bactericidas agrícolas e avaliação dos  
seus resíduos em tomates produzidos em estufa e cultura de campo /  
Patrícia Penido Maia. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas Faculdade  
de Engenharia de Alimentos

1. Antimicrobianos. 2. Oxitetraciclina. 3. Estreptomicina. 4.  
Tomates. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo . II. Universidade  
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.  
Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Oxytetracycline in tomatoes and agricultural antimicrobials and evaluation of  
residues in tomatoes grown in greenhouse and open field

Palavras-chave em inglês (Keywords): Antimicrobials, Oxytetracycline, Streptomycin, Tomatoes

Titulação:Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes

Elizabeth de Souza Nascimento

Isarita Martins

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Marilí Villa Nova Rodrigues

Flávia Pereira da Silva Airolti

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
(Orientador)

---

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento  
(Membro)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Isarita Martins  
(Membro)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli  
(Membro)

---

Dra. Marilí Villa Nova Rodrigues  
(Membro)

---

Dra. Flávia Pereira da Silva Airoidi  
(Membro)



## AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador **Felix Guillermo Reyes Reyes**, pela sua orientação e amizade durante a realização deste trabalho.

À professora **Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira**, meu agradecimento especial, pela amizade, carinho, aprendizado, incentivo e oportunidade de realizar esta pós-graduação. Sem o seu apoio nada disso seria possível.

À professora **Susanne Rath** pela amizade, cooperação, sugestões e ensinamentos durante o curso.

Ao professor **Ernani Clarete** pela colaboração de suma importância para a realização desta pesquisa.

À **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, especialmente ao Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade em realizar o curso.

Aos **funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos** e da **Universidade Federal de Alfenas**, pelo apoio sempre que necessário.

Aos membros da **Banca Examinadora** pelas sugestões apresentadas.

À **CAPES**, pela bolsa de estudo concedida

Aos **colegas de curso**, pelo carinho e amizade.

Ao meu marido **Marcílio** pelo amor, compreensão, apoio e estímulo constante.

Meu sincero amor e agradecimento a minha mãe, **Tonete**.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma auxiliaram a realização desse trabalho.

Muito obrigada.

*Patrícia*



## ÍNDICE

<b>RESUMO GERAL</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	3
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	5
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	8
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Antimicrobianos em alimentos de origem vegetal - uma revisão</b> .....	9
Resumo.....	11
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Antimicrobianos.....	15
Legislação.....	19
Aspectos analíticos.....	21
Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas.....	31
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design</b> .....	35
Abstract.....	37
Introduction.....	37
Experimental.....	40
Results and Discussion.....	44

Conclusions.....	56
References.....	56

### **CAPÍTULO 3**

<b>Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection.....</b>	<b>59</b>
---	-----------

Abstract.....	61
Introduction.....	61
Experimental Procedures.....	64
Results and Discussions.....	68
Conclusions.....	76
References.....	76

### **CAPÍTULO 4**

<b>Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse.....</b>	<b>79</b>
---	-----------

Abstract.....	81
Introduction.....	81
Experimental Procedures.....	85
Results and Discussion.....	89
Conclusions.....	92
References.....	93



## TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - Antimicrobianos em alimentos de origem vegetal - uma revisão**

Tabela 1- Doenças de origem bacteriana e agente causador em diversas culturas agrícolas.....	13
Tabela 2- Valores de LMR e intervalo de carência estabelecidos pela legislação brasileira para a oxitetraciclina e estreptomicina em diferentes alimentos de origem vegetal.....	21

### **CAPÍTULO 2 - Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design**

Table 1- Nominal values corresponding to -1 and +1 in the first experimental design.....	42
Table 2- Nominal values corresponding to -1.41, -1, 0, +1 and +1.41 in the second experimental design.....	43
Table 3- System suitability parameters for CZE.....	49
Table 4- Quantitative features for STP and OTC.....	50
Table 5- OTC content determined in commercial samples of bactericidal formulations by CZE and HPLC.....	53

Table 6-	STP content determined in commercial samples of bactericidal formulations by CZE and recovery tests.....	54
----------	--	----

**CAPÍTULO 3 - Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection**

Table 1-	System suitability parameters for HPLC.....	72
----------	---	----

Table 2-	Quantitative features for OTC.....	73
----------	------------------------------------	----

Table 3-	Oxytetracycline levels (n=5) in tomato extracts.....	74
----------	--	----

Table 4-	Oxytetracycline levels (n=3) in tomato extracts analysed over one week period.....	75
----------	--	----

**CAPÍTULO 4 - Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse**

Table1-	Quantitative features for OTC.....	90
---------	------------------------------------	----

Table2-	Levels of OTC in tomatoes produced by two different cultivation systems, expressed as $\mu\text{g kg}^{-1}$ .....	91
---------	---	----

## FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 - Antimicrobianos em alimentos de origem vegetal - uma revisão**

- Figura 1- Estrutura química da oxitetraciclina..... 16
- Figura 2- Estrutura química da estreptomicina..... 18

### **CAPÍTULO 2 - Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design**

- Figure 1- Structures of (a) streptomycin and (b) oxytetracycline..... 39
- Figure 2- Response surfaces for streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) showing the area as a function of significant parameters voltage (kV) and temperature (°C), obtained using a  $2^2$  experimental design with central composite design..... 47
- Figure 3- A typical electropherogram of  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  of (1) streptomycin and (2) oxytetracycline ( $t_{m1}$  7.7 min and  $t_{m2}$  18.7 min, respectively). Capillary: uncoated fused silica; background electrolyte, a solution of 0.10 M sodium phosphate, pH 2.5; temperature, 20.0 °C; applied voltage, 7.0 kV; detection wavelength, 195 nm..... 48

Figure 4-	Recoveries (%) of streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) after exposure of standard solutions ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) to temperature ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 0.010 and 0.10 M HCl, 0.010 and 0.10 M NaOH and 3% v/v $\text{H}_2\text{O}_2$ for one hour and 0.010 M HCl, 0.010 M NaOH and 3% v/v $\text{H}_2\text{O}_2$ for twenty four hours.....	51
Figure 5-	Counter plots for streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) used to evaluate the ruggedness of the method selected by the 2 <sup>2</sup> experimental design as a function of significant parameters voltage (kV) and temperature ( $^\circ\text{C}$ ).....	55

### **CAPÍTULO 3 - Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection**

Figure 1-	Chromatograms of the extracts from (a) a known negative tomato sample and (b) spiked tomatoes at fortification level of $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ for OTC and TC using the optimized HPLC conditions. Mobile phase: 0.035 M calcium chloride, 0.025 M EDTA and 0.075 M sodium acetate buffer at pH 7.3 and methanol (70:30, v/v); oven temperature $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , flow rate of $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ . Retention times of OTC and TC: 6.6 and 10.8 min, respectively.....	70
Figura 2-	Recoveries (%) of oxytetracycline (OTC) and tetracycline (TC) after exposure of standard solutions ( $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) to temperature ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 0.010 and 0.10 M HCl, 0.010 and 0.10 M NaOH and 3% v/v $\text{H}_2\text{O}_2$ for one hour and 0.010 M HCl, 0.010 M NaOH and 3% v/v $\text{H}_2\text{O}_2$ for twenty four hours.....	74

**CAPÍTULO 4 - Residue content of oxytetracycline applied on tomatoes grown in open field and greenhouse**

Figure 1- Percentages of detected average of OTC residues in tomatoes grown in open field and greenhouse after chemical treatment in different days of application. Day 5 and Day 6 not detectable ( $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ )..... 91

<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>96</b>
-------------------------------	-----------

## **ANEXOS**

Anexo I - Resumo apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Recife, PE, 09 a 12 de Outubro de 2005. Publicado na Revista Brasileira de Toxicologia, v.18, n.1, 2005, p.171.....	99
Anexo II - Resumo apresentado 58a. Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, SC, 16 a 21 de Julho de 2006. Publicado no livro eletrônico de Resumos.....	101
Anexo III - Resumo apresentado no XI International Congress of Toxicology, Montréal, Canadá, 15 a 19 de Julho de 2007. Publicado no livro eletrônico de Resumos.....	103

# **OXITETRACICLINA EM TOMATES E BACTERICIDAS AGRÍCOLAS E AVALIAÇÃO DOS SEUS RESÍDUOS EM TOMATES PRODUZIDOS EM ESTUFA E CULTURA DE CAMPO**

## **RESUMO GERAL**

Antimicrobianos como fungicidas e/ou bactericidas têm sido utilizados para a melhoria da qualidade de produtos vegetais destinados à alimentação humana ou para sua maior produtividade em várias fases de sua obtenção, tais como: preparo do solo, crescimento, colheita, industrialização e comercialização. Entretanto, vários destes compostos podem permanecer como resíduos nos alimentos consumidos, e, dependendo de sua toxicidade e nível de exposição, podem apresentar risco à saúde do consumidor. Entre estas substâncias estão os agentes antimicrobianos usados para combater ou prevenir o aparecimento de alterações de origem microbiana no alimento. O desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação e quantificação destes agentes em produtos vegetais é de grande interesse, uma vez que a exposição crônica em baixos níveis antimicrobianos pode promover a resistência bacteriana a antibióticos, assim como reações alérgicas. Dessa forma, o presente trabalho objetivou desenvolver metodologia para o isolamento, identificação e quantificação de resíduos de oxitetraciclina em tomate, o qual é muito sensível a bacterioses, assim como comparou os níveis residuais encontrados nos frutos de cultura protegida (estufa) e cultura de campo. A metodologia analítica desenvolvida foi aplicada na análise de tomates comercializados na região de Campinas/SP e Alfenas/MG. Os dados obtidos foram comparados com os limites máximos de resíduos (LMRs) e os intervalos de segurança estabelecidos pela legislação brasileira em condições de plantio no campo. Foi validado, ainda, um método para quantificação dos antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina em formulações para uso agrícola utilizadas para tratamento de tomates.

Palavras-chave: antimicrobianos, oxitetraciclina, estreptomicina, tomates.





## SUMMARY

Antimicrobials as fungicides and/or bactericides have been used for the improvement of the quality of vegetal products destined to the human feed and for its higher productivity in some phases of its cultivation, such as: preparation of the ground, growth, harvest, industrialization and commercialization. However, several of these compounds can remain as residues in consumed foods, and, depending on its toxicity and level of exposure, they can present a risk to the health of the consumer. Among these substances are the antibiotics used to combat or to prevent the appearance of alterations of microbial origin in the food. The development of analytical methods for the identification and quantification of these agents in vegetal products is of great interest, once the chronic exposure to low levels of antimicrobials can promote bacterial resistance to the antibiotics, as well as allergic reactions. Therefore, the present study aimed to develop a methodology for the isolation, identification and quantification of residues of oxytetracycline in tomato, which is very sensible to bacterioses, as well as was compared the residual levels found in fruits cultivated in greenhouse and open field. The developed analytical methodology was applied in the analysis of tomatoes purchased in the region of Campinas/SP and Alfenas/MG. The obtained data were compared with the maximum residue limits (MRLs) and the intervals of security established by the Brazilian legislation in conditions in the field. It was validated a method for quantification of antibiotics oxytetracycline and streptomycin in agricultural formulations used for treatment of tomatoes.

Keywords: antimicrobials, oxytetracycline, streptomycin, tomatoes.



## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, grande parte da segurança alimentar repousa no controle de resíduos de substâncias químicas nos alimentos em decorrência do uso de praguicidas e medicamentos veterinários, bem como por acidentes envolvendo contaminantes ambientais. De um modo geral, é importante considerar se a substância deixa resíduo; a toxicidade do resíduo para a saúde do consumidor; o potencial de exposição da população ao resíduo, referenciado pelos hábitos alimentares, pelo poder aquisitivo das populações e pela poluição ambiental; o potencial do uso inadequado de medicamentos que resultam em resíduos, evitado pela utilização de boas práticas agrícolas e pecuárias, especialmente quanto ao uso correto de praguicidas e medicamentos veterinários - indicação, dose, via de administração, tempo de carência e descarte de embalagens e a disponibilidade de metodologias analíticas adequadas, confiáveis, exeqüíveis e compatíveis com os recursos laboratoriais (BRASIL, 1999).

A análise de resíduos está relacionada com a segurança alimentar e envolve a determinação da segurança do alimento ao consumo humano. A garantia de inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumo quanto à presença de resíduos decorrentes do emprego de medicamentos veterinários, agroquímicos e contaminantes ambientais, é possibilitada pelo controle dessas substâncias. Para substâncias químicas usadas na agricultura, a análise de resíduos é parte de programas de monitoramento das agências regulatórias. Testes são designados para garantir que os resíduos estejam em níveis que respeitem os limites máximos permitidos e em concordância com as legislações (BRASIL, 1999; O'KEEFE, 2000).

O desenvolvimento da agricultura, a ampliação das fronteiras agrícolas, a modernização dos meios da produção agropecuária e, principalmente, a demanda dos mercados por produtos em quantidade e em qualidade, têm exigido o uso de praguicidas para a garantia de sua produtividade. No esforço de minimizar os danos causados pelos inimigos das lavouras, tem-se adotado vários métodos que,

isoladamente ou associados, na forma de controle integrado, conseguem reduzir a baixos níveis os prejuízos causados por pragas, doenças e plantas daninhas (TREVIZAN, 2003).

Uma grande variedade de substâncias antimicrobianas é usada na produção animal e vegetal em todo mundo. Os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de determinadas cepas bacterianas, fungos e actinomicetos. Podem, em soluções diluídas, impedir temporariamente ou definitivamente as funções vitais de outras bactérias, determinando os conhecidos efeitos bacteriostáticos e/ou bactericidas. O uso correto desses medicamentos para o tratamento e prevenção de doenças está amplamente difundido na agricultura e pecuária. No Brasil, o controle de doenças bacterianas em alimentos de origem vegetal é feito pelo uso dos antimicrobianos oxitetraciclina (OTC) e estreptomicina (STP). Nos últimos anos, verifica-se uma preocupação crescente quanto ao uso dessas substâncias em dietas animais e no controle de alterações de origem microbiana em alimentos. Estes medicamentos detêm amplo espectro de variação em relação a sua toxicidade, níveis seguros de resíduos e intervalos de segurança bem definidos. Além disso, é de conhecimento público que o uso indiscriminado dessas substâncias promove o desenvolvimento de microrganismos resistentes, dificultando a ação da antibioticoterapia (BRASIL, 1985; BRASIL, 1999).

A justificativa principal deste trabalho é a verificação do uso correto e seguro do antimicrobiano oxitetraciclina de acordo com as práticas agrícolas recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incremento da produtividade agrícola, visando ofertar aos consumidores alimentos seguros e competitivos, bem como, evitar que a presença de resíduos possam constituir barreiras às exportações de produtos de origem vegetal. Visto que os antimicrobianos são substâncias que possuem propriedades tóxicas e levando em consideração que alimentos de origem vegetal como o tomate, são consumidos pela população, seja na forma *in natura* ou industrializada, justifica-se essa pesquisa na tentativa de estabelecer uma metodologia analítica adequada para

avaliar a presença de resíduos nessa matriz. Essa justificativa é reforçada quando se constata através de revisões na literatura, que praticamente não existem informações sobre a determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem vegetal no Brasil.

Da mesma forma, foram avaliados os bactericidas agrícolas comerciais disponíveis no mercado a base dos antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina. O controle de qualidade dos medicamentos tem importância significativa devido ao fato dos mesmos poderem conter impurezas ou produtos de degradação, já que as tetraciclinas possuem baixa estabilidade, o que implicaria num mau uso do produto comercial com possível diminuição da atividade antimicrobiana (OKA et al., 2000).

A validação da metodologia analítica para detecção de antibióticos em alimentos de origem vegetal faz frente à necessidade de se avaliar continuamente os níveis desses resíduos nos alimentos, sejam eles produzidos pelo plantio convencional (campo) ou na forma protegida (estufa). Os dados obtidos neste estudo fornecerão subsídios para possíveis ações de fiscalização com vistas à segurança alimentar evitando possíveis danos à saúde humana, bem como a verificação dos limites máximos de resíduos e os intervalos de segurança autorizados pela legislação em vigor.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os níveis de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina em tomates, a partir do sistema de cultura protegida, e comparar estes resultados com aqueles obtidos através da cultura de campo. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico para a determinação desse antimicrobiano em tomate;
2. aplicação da metodologia desenvolvida em tomates comercializados na região de Campinas/SP e Alfenas/MG;
3. comparação entre os níveis residuais de oxitetraciclina encontrados nos frutos de cultura protegida com aqueles verificados em condições de plantio no campo;

4. quantificação dos antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina em formulações para uso agrícola utilizadas para tratamento de tomates tratados com antimicrobianos.

A avaliação dos dados obtidos nesta pesquisa poderá ser usada para contemplar, atender e fortalecer ações governamentais no sentido de proteger a saúde dos consumidores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº 10/SNVS de 08 de março de 1985. Publicada no Diário Oficial da União em 14/03/85, disponível em:

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=284&word=> (Acesso em 30nov.2006).

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 42 de 20 de dezembro de 1999, disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717> (Acesso em 30nov.2006).

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

O'KEEFE, M. Residue Analysis in Food. Principles and Applications, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000.

TREVIZAN, L.R.P. Resíduos de acefato, de seu metabólito metamidofós e de clorotalonil em cultura protegida de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de campo. Piracicaba, 2003. p.1-3. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

## **CAPÍTULO 1**

### **ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL - UMA REVISÃO**

**Este trabalho será enviado para publicação na revista Segurança Alimentar e Nutricional - NEPA - UNICAMP**





## **ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL - UMA REVISÃO**

### **RESUMO**

Doenças de origem bacteriana em frutas e hortaliças ocorrem no campo ou após a colheita, reduzem a produção e afetam a qualidade do produto para a comercialização e, muitas vezes, causam prejuízos elevados ao agricultor. O alto teor de água de frutas e hortaliças torna esses alimentos sensíveis ao ataque de bactérias. Para prevenir as perdas econômicas decorrentes de doenças bacterianas em alimentos de origem vegetal, o controle químico é feito com o uso de bactericidas agrícolas como a oxitetraciclina e estreptomicina. Esta revisão tem por objetivo abordar os antimicrobianos permitidos pela legislação brasileira para o uso em lavouras, a legislação e métodos analíticos que podem ser utilizados para avaliação da presença de resíduos dos mesmos em vegetais.

Palavras-chave: antimicrobianos, vegetais, oxitetraciclina, estreptomicina.

### **ABSTRACT**

Bacterial diseases in fruits and vegetables occur in the field or after the harvest, reduces the production and affects the product quality for the commercialization and, many times, cause high damages to the agriculturist. The high water content in fruits and vegetables allow bacterial attack. To prevent economic losses from bacterial disease in food of vegetal origin, chemical control is made with the use of bactericidal products to be used in agriculture as oxytetracycline and streptomycin. This paper presents a review about antimicrobials allowed for the Brazilian legislation for the use in farming, the legislation and the analytical methods that can be used for evaluation of the presence of these residues of antimicrobials in vegetables.

Keywords: antimicrobials, vegetables, oxytetracycline, streptomycin.

## Introdução

Antimicrobianos são substâncias químicas que combatem ou inibem o crescimento de outros organismos e têm sido utilizados para o controle de certas doenças de origem bacteriana em frutos de alto valor, vegetais e plantas ornamentais<sup>[1]</sup>. O uso de antimicrobianos também é uma importante ferramenta da medicina veterinária para a criação de animais e insetos utilizados na produção de alimentos. Atualmente, os antimicrobianos são usados para tratar infecções (uso terapêutico), prevenir o aparecimento de infecções (profilático) e melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento)<sup>[2]</sup>.

A sofisticação das técnicas utilizadas na produção agrícola, buscando atender um mercado exigente em produtos de alta qualidade e durante todo o ano, tem aumentado o uso dessas substâncias nas lavouras. No plantio em campo e em ambientes protegidos, face ao problema causado por insetos e ácaros, além de fungos e outros agentes fitopatogênicos como as bactérias, têm-se usado principalmente substâncias químicas para controle e preservação das colheitas<sup>[3]</sup>.

Assim, doenças causadas por bactérias tornam-se em geral problema na produção de alimentos. Cada espécie de fruta ou hortaliça é afetada por uma ou mais espécies de bactérias. Em tomates, a mancha bacteriana é causada pela *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; a pinta bacteriana, pela *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; a necrose-da-medula tem como agente causador a *Pseudomonas corrugata*; o talo-oco ou podridão-mole é causado pela *Erwinia* spp. e o cancro bacteriano é uma infecção causada pela *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. O diagnóstico definitivo das bacterioses é baseado nos sintomas distintos no fruto e no isolamento e caracterização do organismo causador<sup>[4,5]</sup>.

A Tabela 1 apresenta algumas das doenças de origem bacteriana que podem ocorrer nas diversas culturas de frutas e hortaliças.

Tabela 1. Doenças de origem bacteriana e agente causador em diversas culturas agrícolas <sup>[3]</sup>.

Cultura	Doença	Agente causador
ameixa	mancha bacteriana	<i>Xanthomonas pruni</i>
batata	canela preta, podridão mole	<i>Erwinia caratovora</i>
café	mancha aureolada, crestamento bacteriano	<i>Pseudomonas garcae</i>
maracujá	mancha oleosa	<i>Xanthomonas passiflorae</i>
pêssego	mancha bacteriana	<i>Xanthomonas pruni</i>
pimentão	mancha bacteriana	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>

O controle a bacterioses é feito preferencialmente pela combinação de várias medidas incluindo o tratamento das sementes, o uso de antimicrobianos, boas técnicas de manejo, fumigação, desinfecção e rotação de culturas <sup>[3,6]</sup>.

Quando as condições ambientais estiverem favoráveis à ocorrência de doenças bacterianas, os antimicrobianos devem ser usados de maneira preventiva. Esta eficiência diminui à medida que a doença se instala e as condições climáticas se tornam muito favoráveis à doença. A aplicação de maneira repetida e freqüente leva à seleção e predominância, na população bacteriana, de bactérias com resistência aos princípios ativos, fazendo com que o produto agrícola perca a eficiência. Estes produtos podem ser usados intercalados ou, em alguns casos, misturados com fungicidas para o controle de doenças fúngicas <sup>[3]</sup>.

O uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos na produção agrícola e animal facilita o surgimento de bactérias e outros microrganismos resistentes. A resistência pode ser desenvolvida por mutação, aquisição de genes

ou a combinação de ambos. Em humanos, como conseqüência da exposição indevida aos antimicrobianos ou aos microorganismos resistentes, poderá ocorrer redução da eficácia dos medicamentos <sup>[7]</sup>.

Os resíduos de antimicrobianos em alimentos podem expor os consumidores aos riscos conseqüentes da ingestão e do uso indiscriminado destas substâncias. Para reduzir estes riscos é importante fazer o monitoramento dos níveis de resíduos nos alimentos comercializados <sup>[8]</sup>.

Os métodos de análises de resíduos têm tido um enorme avanço desde o início dos anos 1980. Os avanços são constatados nos equipamentos analíticos, bem como na parte de aquisição de dados, em todos os estágios do processo analítico. Muitos desses avanços têm sido direcionados a um aumento da sensibilidade e seletividade nas técnicas de determinação. A demanda regulatória para o controle de contaminantes químicos em alimentos tem aumentado na última década, uma vez que as legislações passaram a ter uma importante relevância no comércio internacional de gêneros alimentícios, o que levou a um aumento na demanda de métodos analíticos para a detecção de resíduos em alimentos. As técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência, cuja versatilidade permite análises de resíduos de antibióticos em amostras biológicas <sup>[9]</sup>.

São muitos os estudos encontrados na literatura apresentando métodos de análise visando a separação, identificação e quantificação de antimicrobianos como as tetraciclina com o objetivo de monitorar esses resíduos nos vários tipos de alimentos, material biológico e formulações farmacêuticas. Um artigo de revisão de OKA et al. <sup>[9]</sup> considera os mais recentes métodos de análise de tetraciclina incluindo desde a cromatografia em camada delgada, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC). Dentre as várias matrizes apresentadas, os alimentos de origem animal estão como os mais presentes objetos de estudo, incluindo o leite, ovos, mel, carne de diversos animais, ovos, peixes e camarões, entre outros.

Atualmente, os antimicrobianos mais comumente usados em plantas são a oxitetraciclina (OTC) e a estreptomicina (STP) <sup>[1]</sup>. O Brasil permite o uso destes antimicrobianos na agricultura em diversos alimentos de origem vegetal, tais como frutas, hortaliças, cucurbitáceas, raízes e tubérculos. Porém, até o momento, não estão disponíveis na literatura métodos de análise para a determinação de OTC e STP nessas matrizes.

Esta revisão tem por objetivo abordar os antimicrobianos permitidos pela legislação brasileira para o uso em lavouras, a legislação e métodos analíticos que podem ser utilizados para avaliação da presença de resíduos dos antimicrobianos em vegetais, com ênfase nos procedimentos de preparo das amostras para análise por CLAE e EC.

## **Antimicrobianos**

### *Oxitetraciclina*

Os antibióticos do grupo das tetraciclinas são produzidos por *Streptomyces* e têm largo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo especialmente efetivos contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Cholera*, *Dysentery bacillis*, *Pertussis*, *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Mycoplasma*. São também efetivas contra alguns anaeróbios e têm sido largamente usadas no tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais <sup>[10]</sup>.

As tetraciclinas são ativamente transportadas para dentro das células de bactérias susceptíveis e exercem um efeito bacteriostático pela inibição da biosíntese de proteínas após a ligação à subpartícula 30S ribossomal. Desde que o primeiro membro da família tetraciclina, a clortetraciclina, foi isolada em 1948, oito tetraciclinas são agora disponíveis comercialmente, das quais a oxitetraciclina (Figura 1), tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina são comumente aplicadas como medicamento veterinário na produção de alimentos produzidos por animais,

incluindo o mel de abelha, devido ao seu largo espectro e vantagens econômicas<sup>[9]</sup>.

A oxitetraciclina, [4S - (4 $\alpha$ , 4a $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 5a $\alpha$ , 6 $\beta$ , 12a $\alpha$ )] - 4 - (dimetilamino) - 1,4,4a,5,5a,6,11,12a - octaidro - 3,5,6,10,12,12a - hexaidroxi - 6 - metil - 1,11 - dioxo - 2 - naftacenocarboxamida, cuja fórmula molecular é C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, tem massa molar de 460,44 g/mol<sup>[11]</sup>.

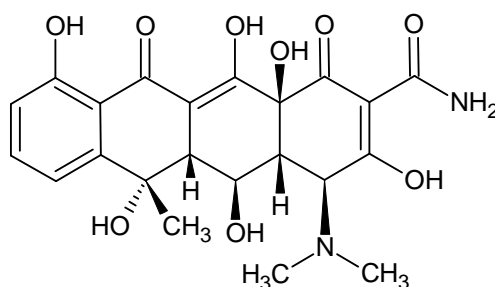


Figura 1 - Estrutura química da oxitetraciclina

As tetraciclina têm propriedades químicas e físico-químicas similares. São compostos anfotéricos com valores característicos de pH e formam hidratos cristalinos e sais com ácidos e bases. Seus espectros de UV mostram fortes absorções em torno de 270 a 360 nm em soluções neutras e ácidas, respectivamente, são solúveis em ácidos, bases, álcoois e solventes orgânicos apolares, e são extraídas com vários solventes como n-butanol e acetato de etila. A estabilidade das tetraciclina é baixa sob condições fortemente ácidas e alcalinas e formam epímeros reversíveis. Elas também produzem forte fluorescência com íons metálicos ou sob condições básicas. Formam complexos quelatos com íons metálicos e se ligam com proteínas ou grupos silanóis na fase estacionária de colunas em fase reversa<sup>[12]</sup>.

A larga utilização das tetraciclina tem levado a um aumento no fator de resistência ao antimicrobiano, cuja monitorização é requerida pelas agências de saúde pública. Ensaio microbiológicos são comumente usados para determinar resíduos de tetraciclina em alimentos, porém esses métodos não são rápidos, e

apresentam baixa sensibilidade. Preparações farmacêuticas de tetraciclina contêm pequenas quantidades de impurezas ou produtos de degradação. No caso da oxitetraciclina, podem estar presentes os seguintes compostos: 4-epioxitetraciclina, anidroxitetraciclina e  $\alpha$ - e  $\beta$ -apoxitetraciclina. Estes produtos de degradação podem ocorrer pela deidrogenação ou epimerização sob as condições de estocagem, devido à baixa estabilidade das tetraciclina. Por esta razão, são também necessários métodos precisos de análise cromatográfica para as impurezas e produtos de degradação<sup>[9]</sup>.

Na agricultura, a resistência de patógenos de plantas a oxitetraciclina é rara, mas cepas estreptomicina-resistentes de *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas campestris* têm impedido o controle de várias doenças importantes<sup>[13]</sup>.

### *Estreptomicina*

A estreptomicina (Figura 2) pertence à classe de antibióticos conhecidos como aminoglicosídeos, a qual engloba compostos que exibem atividade contra o crescimento de bactérias aeróbias gram positivas e gram negativas, incluindo a maioria das espécies de *Pseudomonas*. São de baixo custo e potencialmente oto e nefrotóxicos. Os aminoglicosídeos são antibacterianos cujo efeito primário é a inibição irreversível da síntese protéica bacteriana. O evento inicial da ação de um aminoglicosídeo é a penetração através da parede celular, a qual ocorre por transporte ativo e por difusão passiva. Sua eficácia é dependente da pressão de oxigênio e da existência de um gradiente eletroquímico próprio em cada lado da membrana celular<sup>[14]</sup>.

A estreptomicina, o mais antigo dos aminoglicosídeos, foi primeiramente isolada de *Streptomyces griseus* em 1944. Outros aminoglicosídeos sucederam à estreptomicina como isolados de organismos *Streptomyces* similares ou como moléculas semi-sintéticas, entre eles, a gentamicina, neomicina, kanamicina A,

bekanamicina, butirosina A e B, amicacina, dibecacina, dihidroestreptomicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina e tobramicina<sup>[14]</sup>.

A estreptomicina, O - 2 - deoxi - 2 - (metilamino) -  $\alpha$  - L-glucopiranosil - (1->2) - O - 5 - deoxi - 3 - C -formil -  $\alpha$  - L-lixofuranosil - (1->4) - N,N'- bis (aminoiminometil) - D - estreptamina, cuja fórmula molecular é  $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ , tem massa molar de 581,58 g/mol. Os sais de estreptomicina são muito solúveis em água e muito pouco solúveis em álcool, clorofórmio e éter<sup>[11]</sup>.

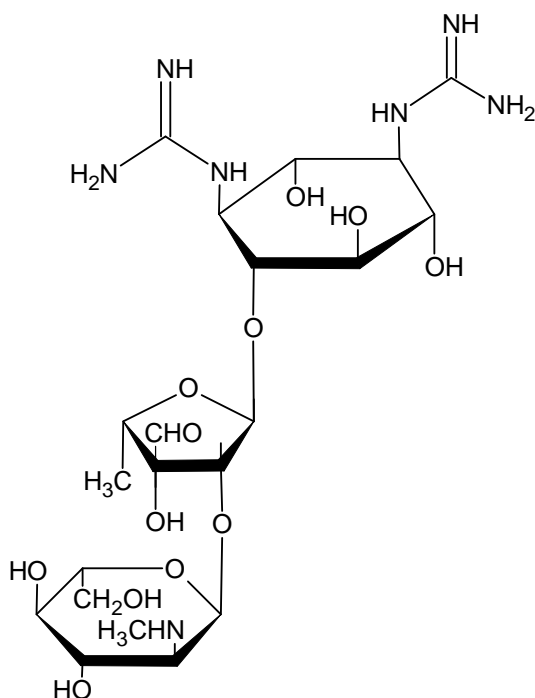


Figura 2 - Estrutura química da estreptomicina

A maioria dos antibióticos interfere com a biosíntese ou função de macromoléculas. Há pelo menos 14 diferentes sistemas bioquímicos propostos como sítios de ação para a estreptomicina. Na presença da estreptomicina, a atividade enzimática da célula microbiana declina, sendo que o principal evento associado à ação antimicrobiana inicia-se quando a estreptomicina se liga à proteína S12 da subunidade 30S do ribossomo, provocando danos importantes à membrana celular na sua função e/ou estrutura. Todavia, alterações químicas na



membrana têm sido verificadas em concentrações menores do que aquelas necessárias para inibir o crescimento microbiano <sup>[15]</sup>.

Como a estreptomicina é também usada como fármaco veterinário, seus resíduos poderão ser encontrados em carne, fígado, rim, leite e mel. Se as concentrações de estreptomicina no alimento não tem efeito tóxico agudo, numerosos casos de hipersensibilidade alérgica associados à exposição à estreptomicina foram evidenciados durante os últimos anos, podendo produzir severas erupções na pele. Por essas razões, o controle de resíduos deste antimicrobiano em alimentos torna-se necessário <sup>[16]</sup>.

## **Legislação**

Aspectos toxicológicos devido à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos tem sido avaliado pelo Comitê FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA - *Joint Expert Committee of Food Additives*), o qual estabelece valores de ingestão diária aceitável (IDA) para essas substâncias. IDA é uma estimativa da quantidade de uma substância, expressa em mg/kg de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente, por toda vida, sem oferecer dano à saúde humana, com base nas informações toxicológicas disponíveis na época da avaliação <sup>[17]</sup>. Nessas avaliações são levados em consideração todos os dados disponíveis na literatura sobre parâmetros biológicos e toxicológicos do antimicrobiano em questão <sup>[8]</sup>. Cabe mencionar que o JECFA é órgão assessor do *Codex Alimentarius*.

A exposição dos consumidores aos resíduos presentes nos alimentos tem sido estimada através de estudos também conduzidos por agências internacionais, tais como a OMS (Organização Mundial da Saúde) e a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura). Esses estudos determinam o quanto a população está exposta aos resíduos presentes em alimentos e a comparação desses com os valores de IDA permitem avaliar o

risco à saúde humana devido à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos <sup>[17]</sup>.

O JECFA, em sua 58<sup>a</sup> reunião (1998), estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA de grupo) de 0-0,03 mg/kg para a oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina <sup>[18]</sup> e, em sua 48<sup>a</sup> reunião (1997), estabeleceu uma IDA de grupo de 0-0,05 mg/kg para a estreptomicina e dihidroestreptomicina <sup>[19]</sup>. Para esses dois grupos de antimicrobianos, nenhum limite máximo de resíduo foi recomendado para alimentos de origem vegetal.

A Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) estabeleceu valores de tolerância de 0,35 mg/kg para resíduos de oxitetraciclina em frutas como pêssego e pêra, e de 0,25 mg/kg para a estreptomicina em pêra, maçã, batata, aipo, pimenta e tomates <sup>[20]</sup>.

Segundo a Instrução Normativa n<sup>o</sup> 42, de 1999, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, o controle oficial de resíduos de praguicidas em alimentos é geralmente baseado nos limites máximos de resíduos (LMRs) ou tolerâncias e nos intervalos de segurança (períodos de carência), estabelecidos para cada caso. No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos é competência do Ministério da Saúde <sup>[21]</sup>.

Estudos sobre os efeitos das condições de proteção na produção agrícola, em relação à questão de resíduos nos alimentos, fazem parte da exigência para registro de praguicidas em muitos países, sendo que as condições de condução das culturas protegidas são fatores determinantes na persistência destes resíduos nos produtos agrícolas <sup>[22]</sup>.

De acordo com o Ministério da Saúde <sup>[1]</sup>, dentre a relação de substâncias permitidas para uso fitossanitário e domissanitário, constam a oxitetraciclina e a estreptomicina com uso permitido em alimentos de origem vegetal. Seu emprego é indicado no tratamento de tubérculos e sementes e aplicação em partes aéreas de sementeiras, viveiros em culturas de ameixa, batata, berinjela, café, feijão, fumo, jiló, maracujá, pêssego, pimenta, pimentão, tomate e plantas ornamentais.

Na Tabela 2 são apresentados os limites máximos de resíduos (LMRs) e o intervalo de segurança permitidos pela legislação brasileira para a oxitetraciclina e a estreptomicina, em alimentos de origem vegetal.

Tabela 2. Valores de LMR e intervalo de carência estabelecidos pela legislação brasileira para a oxitetraciclina e estreptomicina em diferentes alimentos de origem vegetal<sup>[1]</sup>.

Cultura	Oxitetraciclina		Estreptomicina	
	LMR ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo de carência (dias)	LMR ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo de carência (dias)
pepino	7	7	0,25	7
ameixa	0,7	7	0,25	7
maracujá	< 0,25	7	0,25	7
berinjela	< 0,25	7	0,25	7
pêssego	-	-	0,25	7
jiló	< 0,25	7	0,25	7
pimenta	< 0,25	7	0,25	7
pimentão	< 0,25	7	0,25	7
tomate	< 0,25	7	0,25	14
batata	< 0,25	7	0,25	7
feijão	-	-	0,25	7
café	< 0,25	7	0,25	7

LMR: limite máximo de resíduo

### Aspectos analíticos

A seguir, uma breve abordagem dos métodos de análise, contemplando as técnicas de extração e clarificação do extrato (pré-tratamento de amostras), assim como as técnicas de separação e determinação que são utilizadas na detecção de

antimicrobianos em diversas matrizes e que podem ser utilizadas em alimentos de origem vegetal.

### *Pré-tratamento de amostras*

#### *Extração em fase sólida*

Uma das técnicas analíticas utilizadas no preparo de amostras complexas para análises é a extração líquido-líquido (ELL). Essa técnica baseia-se na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis. Em geral, o analito de interesse, juntamente com os interferentes, encontra-se presente em uma matriz líquida, como, por exemplo, a água. Essa solução é colocada em um funil de separação ao qual adiciona-se um solvente orgânico imiscível (na prática pouco miscível) com a água. O sistema é agitado e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto os interferentes permanecem, na sua maioria (idealmente na totalidade) na fase aquosa. Além da ELL, várias outras técnicas têm sido empregadas com intuito semelhante, incluindo a destilação, filtração, centrifugação, cromatografia líquida preparativa em coluna aberta e outras<sup>[23]</sup>.

Em meados da década de 70, uma nova técnica foi introduzida, a qual tem sido denominada extração em fase sólida (SPE). Como o objetivo da extração é o isolamento do analito da maneira mais eficiente possível, o uso da extração em fase sólida foi uma grande inovação e, certamente, uma das poucas ocorridas nos últimos anos, diferentemente do constante desenvolvimento das técnicas de identificação. A SPE permite a separação seletiva, a purificação e a concentração de compostos presentes em matrizes complexas, com várias vantagens sobre a tradicional extração líquido-líquido (ELL). Entre elas o uso de pequeno volume de solvente, facilitando o descarte e a evaporação, com evidente proteção ao analista e ao meio ambiente; pouco manuseio da amostra, que passará por etapas de lavagem e eluição na própria coluna; ausência de emulsão, não necessitando

agitação da amostra com o solvente; facilidade de automação; baixo consumo de vidraria; menor tempo de análise e obtenção de extratos mais limpos<sup>[24]</sup>.

A extração em fase sólida é um processo físico que envolve uma fase líquida e outra sólida. Esta última tem maior atração pela substância ou grupo de substâncias em estudo do que o solvente no qual está dissolvida. À medida que a amostra passa pela camada de sorvente, o analito se concentra na superfície, enquanto os outros componentes da amostra são eliminados. Nos anos 1960 surgiu a idéia de tratar grupos silanol com derivados como mono, di e tri-halo ou alcóxi silila para formar siloxanos. Embora a idéia original fosse a conversão de sílica não ligada (polar) em sílica ligada (apolar), atualmente ambos os tipos estão disponíveis no mercado<sup>[25]</sup>.

Segundo ZIEF & KISER<sup>[25]</sup>, as propriedades dos sorventes dependem primariamente do tipo de sílica selecionada. Fases ligadas preparadas com sílica irregular com tamanho médio de partícula de 40 µm, porosidade de 60Å e área de superfície de 500 m<sup>2</sup>/g, fornecem condições ideais de fluxo e pressão.

Os mecanismos de separação envolvidos em SPE são os mesmos da cromatografia líquida: como consequência, as fases sólidas empregadas são as mesmas utilizadas em cromatografia líquida de baixa pressão. A escolha da fase sólida apropriada depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Os principais mecanismos atualmente em uso são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho, sendo o modo fase reversa o mais empregado<sup>[26]</sup>.

A separação em SPE ocorre devido a interações intermoleculares entre o analito e os grupos funcionais do sorvente. Estas interações podem ser apolares, polares ou iônicas. As interações não-polares ou do tipo fase reversa são aquelas entre os grupos CH<sub>n</sub> do sorvente e do analito (forças de Van der Waals ou forças de dispersão). Uma vez que a maioria das moléculas orgânicas tem estrutura parcialmente apolar, este tipo de interação é usada para reter o analito no sorvente. Os sorventes mais utilizados no modo fase reversa são octadecila (Si-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>), octila (Si-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), cicloexila (Si-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>) e fenila (Si-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). Trata-se de

sorventes não-seletivos utilizados no caso de amostras contendo compostos de estrutura e propriedades químicas diferentes. Os solventes polares, como a água, facilitam a ligação dos compostos apolares às cadeias de sorvente, enquanto os menos polares, como o clorofórmio, o hexano e o metanol são usados na eluição, sendo capazes de desfazer a interação apolar entre o analito e o sorvente <sup>[25]</sup>.

As etapas envolvidas na SPE são o condicionamento do cartucho, a adição da amostra, a remoção dos interferentes e a eluição do analito. Pequenas adaptações e modificações podem ser necessárias, dependendo do interesse do experimento <sup>[26]</sup>.

A SPE, em seus vários formatos, tem sido largamente utilizada na determinação de ampla gama de analitos em uma variedade de matrizes em áreas como ambiental, petroquímica, farmacêutica, alimentos, cosméticos, forense, análises clínicas e biológicas. Na análise de alimentos, um grande número de compostos são extraídos através desta técnica, como por exemplo, compostos responsáveis pelo *flavour* em manteiga, aminas aromáticas heterocíclicas formadas durante o aquecimento, inseticidas em frutas, lipídeos em cereais, praguicidas em leite e antocianinas de plantas, entre outros <sup>[27]</sup>.

### *Técnicas de separação*

#### *Eletroforese capilar*

O fenômeno denominado eletroforese é definido como sendo a migração de espécies carregadas eletricamente, que ocorre quando as mesmas estão dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através do qual um potencial é aplicado <sup>[28]</sup>. Esta técnica de separação foi desenvolvida em 1937 pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas em soro, o qual consistia na decomposição do soro sanguíneo em cinco frações protéicas principais <sup>[29]</sup>.

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica micro/macroanalítica versátil que foi introduzida em 1981 e que está ganhando amplo uso na separação e

determinação de substâncias iônicas e não-iônicas. Em sua forma mais simples, a EC é uma aproximação da técnica original e emprega um tubo capilar preenchido com um eletrólito. O mecanismo relativamente simples na separação está relacionado com a velocidade de migração que é baseada no tamanho e carga do analito sob influência de uma voltagem aplicada. Esta técnica tem obtido especial atenção em uma variedade de trabalhos nas áreas focadas em moléculas biologicamente ativas e expandido seu espaço no que diz respeito à instrumentação e aplicação<sup>[30]</sup>.

A EC teve um grande avanço na pesquisa em química analítica na década de 1990, mas ainda apresenta importantes melhoramentos e desenvolvimentos. Métodos de eletroforese em análises de rotina são aplicados na análise de amostras ambientais em indústrias e são considerados como métodos confiáveis quando comparados aos métodos analíticos tradicionais. Detalhes dos métodos são agora incluídos em Farmacopéias e métodos de rotina têm sido submetido às autoridades regulatórias, como o FDA. O uso de EC é rotineiramente utilizado em grande número de aplicações forenses e é uma ferramenta padrão na caracterização de produtos, como proteínas/peptídeos da indústria biotecnológica, além de análises farmacêuticas, separações quirais (resolução de enantiômeros), separação e determinação de íons metálicos e ânions inorgânicos, aplicações em monitorização ambiental, incluindo fenóis, surfactantes, tintas, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, aminas alifáticas e aromáticas, vitaminas hidro e lipossolúveis, catecolaminas, análises de fármacos e carboidratos e diagnósticos clínicos. Em análises agroquímicas, a aplicação da eletroforese capilar tem mostrado sucesso na determinação de muitos fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas em água, solo e gêneros alimentícios. Resíduos de fármacos, tipicamente antibióticos, em alguns gêneros alimentícios de origem animal têm também sido mensurados por eletroforese capilar, como exemplo a oxitetraciclina em tecido de porco e a enrofloxacin em amostras de frango<sup>[31]</sup>.

Segundo FLURER<sup>[32]</sup>, o primeiro estudo com uso de eletroforese capilar na análise de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos utilizou detecção indireta,

em meio ácido, sob condições de polaridade invertida. Os resultados indicaram que foram obtidas boa sensibilidade e seletividade, mas algumas das espécies relatadas não puderam ser separadas. Estudos conduzidos por HOFFSTETTER-KUHN et al. <sup>[33]</sup> utilizaram complexos carregados negativamente, que foram formados entre os carboidratos e o tampão borato, para detecção direta no UV. Ainda, FLURER <sup>[32]</sup> propôs um método para identificação e quantificação de antibióticos glicosídeos por eletroforese capilar utilizando a complexação com borato e detecção direta por UV em preparações farmacêuticas.

Segundo OKA et al. <sup>[9]</sup>, a eletroforese capilar tem muitas vantagens em comparação a CLAE tais como a redução do uso de solventes, curto tempo na separação e alta eficiência de separação. Entretanto, ela tem sido pouco usada em análises de resíduos de fármacos em alimentos, devido ao pequeno volume de injeção da amostra. Porém, esses mesmos autores apresentam uma série de estudos para determinação de tetraciclinas em alimentos, preparações farmacêuticas e materiais biológicos.

Dentre os modos de detecção em EC estão a absorvância UV/VIS (direta ou indireta), a fluorescência e a detecção eletroquímica. Cada um tem suas distintas vantagens e limitações. Algumas outras abordagens em relação à detecção incluem a fluorescência induzida por laser, detector de índice de refração e espectrometria de massas <sup>[31]</sup>.

### *Cromatografia líquida de alta eficiência*

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) originalmente era denominada cromatografia líquida de alta pressão. Esta última terminologia foi abandonada há muito tempo, quando se constatou que o diferencial de comportamento desta para as demais cromatografias líquidas não era a maior pressão, mas sim o melhor desempenho cromatográfico. Os componentes essenciais deste sistema são uma bomba de alta pressão, um sistema de injeção da amostra, uma coluna cromatográfica e um detector <sup>[34]</sup>.



A CLAE é uma técnica de separação que usa um líquido (fase móvel) para carregar a amostra através de uma coluna empacotada com um material (fase estacionária). Os compostos presentes nas amostras são separados em função de suas diferentes interações com a fase móvel e a fase estacionária. É uma técnica versátil e muito utilizada na análise de alimentos para quantificação de carboidratos, vitaminas, aditivos, micotoxinas, aminoácidos, proteínas, triglicerídeos em óleos e gorduras, lipídeos, compostos quirais e pigmentos. Entre os detectores mais utilizados estão o detector de ultra-violeta (UV-VIS), o de fluorescência, o de arranjo de diodos, o eletroquímico e o de índice de refração, bem como o espectrômetro de massas<sup>[35]</sup>.

Algumas vantagens da CLAE são que o procedimento é simples e razoavelmente rápido; a análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida; são requeridas pequenas quantidades do material de análise, bem como, permite o isolamento de frações para posterior análise e de frações enriquecidas com certos analitos para posterior recristalização, purificação e análise<sup>[34]</sup>.

É uma técnica que exige conhecimento do efeito das variáveis cromatográficas sobre as interações intermoleculares que conduzem à separação. Nos últimos anos, a aplicação da CLAE foi direcionada para o desenvolvimento de métodos mais específicos que sejam mais rápidos e possíveis de automatização. A introdução de novos mecanismos de separação como a cromatografia quiral e de imunoafinidade têm contribuído com métodos específicos para separações complexas. A cromatografia de imunoafinidade possui alta seletividade e especificidade na separação de compostos que são capazes de formar um complexo com o ligante (imobilizado no suporte cromatográfico), desse modo permitindo determinações específicas de compostos maiores como as proteínas, lipídeos ou polissacarídeos, bem como de componentes menores que tenham atividade biológica como hormônios, fármacos e toxinas<sup>[36]</sup>.

A CLAE tem sido o principal método de detecção e quantificação empregado na determinação de tetraciclinas. Todavia, a presença de um grande

número de grupos funcionais polares torna sua análise dificultada, pois tendem a interagir fortemente com os silanóis residuais do suporte da fase estacionária. O uso de colunas de sílica de fase reversa *end-capped* tem minimizado este problema. Para os aminoglicosídeos, a CLAE também é utilizada para sua detecção e envolve o uso de colunas de fase reversa <sup>[37]</sup>. Segundo os mesmos autores, as técnicas de cromatografia líquida são sensíveis para a maioria dos antimicrobianos e podem chegar a limites de quantificação de 0,3-0,5 µg/mL e essa sensibilidade pode ser aumentada com o uso de detectores específicos como fluorimétricos, eletroquímicos e de espectrometria de massas.

A detecção das tetraciclinas é comumente feita em detector de UV. Todavia, devido à forte fluorescência por elas produzidas na presença de íons metálicos ou sob condições básicas, muitos métodos de análises cromatográficas de tetraciclinas em alimentos são relatados e a detecção em CLAE é feita por detectores de fluorescência após a degradação sob condições alcalinas e formação de quelatos com íons metálicos <sup>[12]</sup>.

Uma forma de se evitar a formação de complexos quelatos e sua adsorção em colunas de fase reversa é o uso de fase móvel contendo vários ácidos (fosfórico, cítrico, tartárico e EDTA) e cromatografia de par iônico. Entretanto, as tetraciclinas ainda mostram picos com cauda nessas condições, e somente uma fase móvel contendo ácido oxálico é capaz de reduzir esse problema <sup>[9]</sup>.

A espectrometria de massas também tem sido utilizada como um método sensível de detecção e identificação de tetraciclinas. As técnicas de fragmentação aplicadas em análises de alimentos são: *thermospray*, ionização química a pressão atmosférica, *electrospray* e feixe de partículas <sup>[38]</sup>.

Para a determinação de estreptomicina em alimentos de origem animal, EDDER et al. <sup>[16]</sup> propuseram um método confiável e sensível baseado na separação por cromatografia líquida de par iônico com pós-derivatização com β-naftoquinona-4-sulfonato e detecção por fluorescência. A purificação dos extratos foi feita por extração em fase sólida, inicialmente com coluna de troca catiônica seguida de coluna de octadecila.

Métodos alternativos de análises de aminoglicosídeos incluem a cromatografia líquida com derivatização pós-coluna ou com detecção eletroquímica, a cromatografia de par iônico, a eletroforese em gel de agarose, o imunoensaio e a espectrometria de massas<sup>[32]</sup>.

## **Conclusões**

O incremento da produção agrícola nos últimos anos possibilitou que a utilização de antimicrobianos se tornasse uma realidade no Brasil, devido ao fato que algumas culturas são exigentes no trato fitossanitário pela ocorrência de pragas e doenças durante todo o seu ciclo. Como principais conseqüências desta prática podemos destacar dois aspectos: a problemática mundial relacionada ao desenvolvimento de resistência das bactérias à ação dos antimicrobianos e a presença de resíduos desses compostos nos alimentos comercializados.

A exposição a essas substâncias através do consumo de alimentos envolve riscos a saúde do consumidor. Assim, dados sobre os níveis de resíduos são necessários para estabelecer os riscos que essas substâncias oferecem à saúde. A partir destas informações, medidas de vigilância sanitária poderão ser definidas e adotadas pelas agências governamentais que lidam com saúde pública. Para tanto, é importante salientar a necessidade do desenvolvimento de técnicas analíticas que possibilitem a determinação precisa e exata dos possíveis resíduos de antimicrobianos que possam estar presentes nos diversos alimentos, o que aumentaria a confiabilidade nos resultados e, conseqüentemente, a segurança do alimento.

É crescente o número de artigos publicados nas revistas científicas que reportam métodos analíticos para a determinação de antimicrobianos de uso veterinário, fato esse que demonstra a preocupação com o assunto. Por outro lado, dada a falta de metodologias analíticas para a determinação dessas substâncias quando empregadas na agricultura, torna necessário que métodos

sejam desenvolvidos e validados nessas matrizes alimentares, para que ações de vigilância sanitária possam ser tomadas. Os procedimentos analíticos de extração, bem como técnicas de separação e determinação como a CLAE e EC, utilizadas na determinação de antimicrobianos em diversas matrizes biológicas, poderão ser também utilizados em métodos para alimentos de origem vegetal.

O uso de métodos validados para a determinação de OTC e STP em hortifrutícolas, permitirá um controle efetivo tanto no campo como junto aos comerciantes permitindo determinar o nível de resíduos de antimicrobianos nessas matrizes e, assim, poder compará-los com os LMRs estabelecidos pela legislação brasileira. A partir desses dados, seria possível verificar se o produtor respeita as boas práticas agrícolas (ex. nível de uso e intervalo de segurança) preconizadas pelo fabricante do antimicrobiano agrícola e pelas agências regulatórias.

### **Referências bibliográficas**

[1] Brasil. Ministério da Saúde, Portaria nº 10/SNVS de 08 de março de 1985. Publicada no Diário Oficial da União em 14/03/85 Disponível em:

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=284&word=> [Acessado em 2006 nov 30].

[2] OMS. Organização Mundial de Saúde. Report of the Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneve 2003 Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/> [Acessado em 2006 nov 30].

[3] Lopes CA, Quezado AM. Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle. Brasília: Embrapa-CNPq; 1997.

- [4] Pernezny K, Kudela V, Kokoskova B, Hladka I. Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains. *Crop Protection*. 1995; 14:267-270.
- [5] Umesha S. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*. 2006; 25:375-381.
- [6] Rudakov OL, Rudakov VO. Protection of vegetable crops in greenhouses from root rots and wilts. *Zashchita-i-Karantin-Rastenii*. 2000; 10:27-29.
- [7] EMEA - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products / Committee for Veterinary of Medicinal Products (CVMP)/342; 1999.
- [8] Neto JP. O uso adequado de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal: aspectos de farmacocinética e de toxicologia; possíveis impactos na qualidade da proteína de origem animal. Seminário - O uso adequado de antimicrobianos como aditivos melhoradores da eficiência alimentar em animais de produção. São Paulo:SINDAN; 1999. p.20-36.
- [9] Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*. 2000; 882:109-133.
- [10] Goodman GA, Goodman LS, Rall TW, Murad F. (org.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Mac-Millan; 1985.
- [11] Merck Index, 12ed., Rahway; 1996. p.1505, 1197.
- [12] Mitscher LA (org.) *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*. NewYork: Marcel Dekker; 1978.
- [13] Mcmanus PS, Stockwell VO, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. 2002; 40:443-464.
- [14] Bennett CC. The aminoglycosides. *Resident Competition*: 1<sup>st</sup> Place. 1996; 6, n.3.

- [15] Kornder JD. Streptomycin revisited: molecular action in the microbial cell. *Medical Hypotheses*. 2002; 58:34-36.
- [16] Edder P, Cominoli A, Corvi C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1999; 830:345-351.
- [17] Niesink RJM, De Vries J, Hollinger MA. *Toxicology. Principles and Applications*. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1996.
- [18] OMS. Organização Mundial da Saúde. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1998 Disponível em: [http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec\\_1817.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_1817.htm) [Acessado em 2006 nov 30].
- [19] OMS. Organização Mundial da Saúde. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1997 Disponível em: [http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec\\_2203.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_2203.htm) [Acessado em 2006 nov 30].
- [20] EPA. U.S. Environmental Protection Agency 2005 Disponível em: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_05/40cfr180\\_05.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_05/40cfr180_05.html) [Acessado em 2006 nov 30].
- [21] Brasil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 42 de 20 de dezembro de 1999 Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717> [Acessado em 2006 nov 30].
- [22] Trevizan LRP. Resíduos de acefato, de seu metabólito metamidofós e de clorotalonil em cultura protegida de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de campo [tese]. Piracicaba:Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2003. 1-3 p.

- [23] Poole CF, Poole SK. Chromatography today. Elsevier, 1981. Cap. 8 (Sample preparation for Chromatographic Analysis).
- [24] Araujo AC, Salvadori MC. O uso de coluna de fase reversa na extração de fármacos presentes em amostras de urina. Revista Portuguesa de Farmácia. 1994; 44:177-182.
- [25] Zief M, Kiser R. Solid phase extraction for sample preparation. Phillisburg: J. T. Baker; 1988. 58p.
- [26] Lanças FM. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: Rima; 2004.
- [27] Ibañez E, Cifuentes A. New analytical techniques in food science. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2001; 41:413-450.
- [28] Heiger DN. High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E;1997.
- [29] Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Transactions of the Faraday Society. 1937; 33:524-530.
- [30] Ortega N, Albillos SM, Busto MD. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. Food Control. 2003; 14:307-315.
- [31] Altria KD, Elder D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. Journal of Chromatography A. 2004; 1023:1-14.
- [32] Flurer CL. The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1995; 13:809-816.
- [33] Hoffstetter-kuhn S, Paulus A, Gassmann E, Widmer HM. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. Analytical Chemistry. 1991; 63:1541-1547.

[34] Neto FRA, Nunes DSS. Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência; 2003.

[35] Paré JRJ, Bélanger JMR. Instrumental Methods in Food Analysis, Amsterdam: Elsevier; 1997.

[36] Lacourse WR, Dasenbrock CO. Column liquid chromatography: equipment and instrumentation. Analytical Chemistry. 1998; 70:37R-52R.

[37] Joshi S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2002; 28:795-809.

[38] Nakazawa H, Ino, S, Kato K, Watanabe T, Ito Y, Oka H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 1999; 732:55-64.



## **CAPÍTULO 2**

### **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF STREPTOMYCIN AND OXYTETRACYCLINE IN AGRICULTURAL ANTIMICROBIALS BY CZE AFTER AN EXPERIMENTAL DESIGN**

**Trabalho publicado na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 450 - 456, 2007**



# **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF STREPTOMYCIN AND OXYTETRACYCLINE IN AGRICULTURAL ANTIMICROBIALS BY CZE AFTER AN EXPERIMENTAL DESIGN**

## **ABSTRACT**

A capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed and validated for the simultaneous determination of both streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) in bactericidal products to be used in agriculture. Using fused-silica capillaries, the influence of the electrolyte composition, pH and concentration, as well as temperature and applied voltage were investigated using a central composite design to optimize the method. The optimized electrophoretic conditions were as follows: 0.10 M sodium phosphate, pH 2.5, 7.0 kV and 20.0 °C. The method was validated for STP and OTC determination in agricultural formulations through the following performance criteria: linearity and linear range, sensitivity, selectivity, intra-day and inter-day precision, detectability, accuracy and ruggedness. This optimized CZE-method for the identification and quantification of STP and OTC is a potential alternative method to the HPLC methods described by the US Pharmacopeia, with the advantage that the same method could be used for the simultaneous determination of these different antibiotics.

**Key words:** Bactericides, streptomycin, oxytetracycline, capillary electrophoresis.

## **1. INTRODUCTION**

Antibiotics are chemical substances produced by microorganisms that kill or inhibit the growth of other organisms. Streptomycin (STP) belongs to the group of aminoglycosides that are an important class of antibiotics. The aminoglycosides are bactericidal drugs whose primary effect is to cause irreversible inhibition of bacterial protein synthesis. They are active against both gram-positive and gram-

negative bacterial infections, have a low cost when compared with other antibiotics and consist of a disaccharide molecule with a streptidine aminocyclitol moiety. Streptomycin, the earliest of the aminoglycosides, is an antimicrobial organic base produced by *Streptomyces griseus* and has found widespread use in both human and veterinary medicine [1,2]. In agriculture it is used to control bacterial and fungal diseases of selected fruits, vegetables, seeds, specialized field crops, ornamental crops and in ornamental ponds and aquaria to control algae [3].

Oxytetracycline (OTC) is a member of the family of the tetracyclines, a group of clinically important natural products and semi-synthetic derivatives characterized by a broad spectrum of activity against pathogenic microorganisms, including gram-positive and gram-negative bacteria and protozoa. These compounds are bacteriostatic antibiotics that act by inhibiting the formation of proteins within the bacterial cell. They are used to control bacterial infections in humans and animals and have also found applications in preserving harvest fruits and vegetables, exterminating insect pests and supplementing animal feed. The chemical structures of this group of antibiotics are closely related and are derived from a common hydronaphthacene nucleus containing four fused rings. Oxytetracycline is produced industrially through fermentation by *Streptomyces rimosus* [4,5]. The representative molecular structures of the two antibiotics are given in Figure 1.

Some countries, including Brazil, allow the use of these antimicrobials as fungicides and/or bactericides in agricultural commodities for protection against pests. Indeed, STP has regulatory status in the United States and in the Netherlands and OTC is registered for agricultural use in the United States [6]. In Brazil, the Ministry of Agriculture approved the use of STP and OTC for cultivation of tomato, potato, beans, cucumber, coffee, peach, plum, passion fruit and pepper [7].

The determination of aminoglycosides typically requires the utilization of microbiological techniques that are more qualitative than quantitative [8-11]. Chemical methods of analysis have included high performance liquid chromatography (HPLC) with either pre-column [12] or post-column derivatization

[13], HPLC with electrochemical detection [14], ion pair chromatography [15], agarose gel electrophoresis [16], immunoassay [17] and mass spectrometry [18, 19]. These methods are expensive and time-consuming and interference from other materials is frequent. Thus, a simple, inexpensive method is desired for routine analysis.

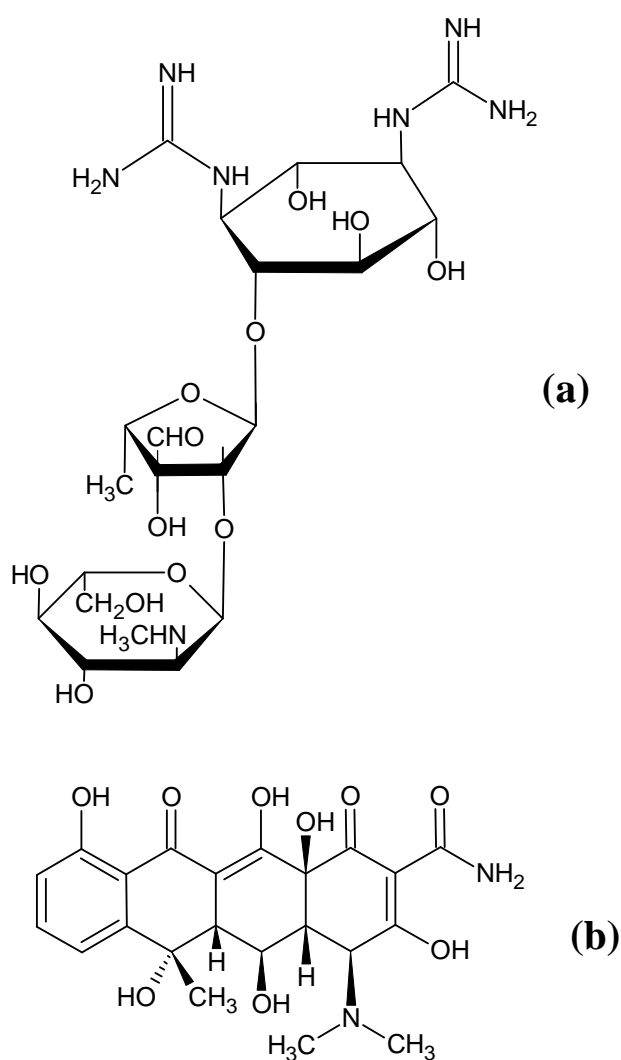


Figure 1- Structures of (a) streptomycin and (b) oxytetracycline.

The physicochemical properties of STP and OTC, their ionic nature, multiple ionization sites, and water solubility [20] make these compounds suitable for electrophoretic analysis. Capillary zone electrophoresis (CZE) is a powerful separation and quantitation technique that often provides higher resolving power, with shorter analysis times and at a lower cost than HPLC, because the consumption of organic solvents is lower, the quartz capillaries are inexpensive, in addition to the minimal environmental impact. CZE is also suitable for automation, high sample throughput and multiple detection modes [21].

Several studies using capillary electrophoresis for the determination of streptomycin [9,11,22,23,24] or oxytetracycline [4,25,26,27,28,29] in a variety of matrices have been reported, but not for both simultaneously. Hsiao et al. [30] proposed a CZE method for the simultaneous determination of STP and OTC, however these authors did not offer a detailed study about the influence of the composition of the electrolyte on the separation of the compounds or indicate the ruggedness of the method.

This paper describes the development of a simple CZE method for the simultaneous determination of both STP and OTC in bactericidal product to be used in agriculture, using experimental planning. The method was validated and its performance compared with the official HPLC method described in the US Pharmacopeia.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1. Instrumental and operating conditions**

The capillary electrophoresis was performed on a Hewlett Packard 3D Capillary Electrophoresis system (Germany), equipped with a diode array detector (DAD). Streptomycin and oxytetracycline were detected at 195 nm. Data were collected using the HP 3D Chemstation software from Hewlett-Packard (Germany). The separations were carried out on a fused-silica capillary (75  $\mu\text{m}$  I.D.) with effective (*l*) and total length (*L*) of 22.5 cm and 31.0 cm, respectively. Injection was

done hydrodynamically for 30 s at 20 mbar. Measurements of pH were made with a DM-20 pH-meter from Digimed (Brazil), using a combined glass electrode. The pH of the electrolyte buffer and dilution buffer were adjusted using 0.10 M NaOH or 10% v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> before making up to volume.

## 2.2. Standards and reagents

Standards of streptomycin sulfate salt and oxytetracycline hydrochloride were purchased from Sigma (USA). Analytical grade disodium hydrogen phosphate, monobasic monohydrate sodium phosphate, sodium hydroxide, hydrochloride acid, phosphoric acid, hydrogen peroxide and methanol were purchased from Merck (Germany).

Throughout the study, water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (USA). Before analysis, all the solutions were filtered through 0.45 µm nylon filters from Millipore (Brazil).

## 2.3. Samples

Ten samples of two commercial powder formulations from different batches were purchased at commercial agriculture stores in Alfenas, MG, Brazil. Five commercial samples contained STP and OTC and five commercial samples contained OTC only. All samples were provided from the same manufacturer (Pfizer).

## 2.4. Standard solutions

Standard stock solutions of STP and OTC were prepared by dilution of appropriate volumes of the standards in methanol to a final concentration of 1 mg ml<sup>-1</sup>. These solutions were stored under refrigeration (4 °C) until use. Working solutions in the concentration range of 20 to 200 µg ml<sup>-1</sup> (STP) and 10 to 210 µg ml<sup>-1</sup> (OTC) were prepared daily by dilution of the standard stock solution in dilution buffer.

## 2.5. CZE procedure

Before daily use, the capillary was sequentially washed with water (10 min), 1 M NaOH (2 min), 0.10 M NaOH (3 min) and run electrolyte (5 min). During the analyses and after each determination the capillary was sequentially washed with water (1.5 min), 1 M NaOH (1 min), 0.10 M NaOH (1 min) and run electrolyte (2 min).

## 2.6. Experimental design for CZE optimization

A first simple factorial plan ( $2^3$ ) was carried out to distinguish the significant parameters by analysis of the effects. The variables evaluated were pH (2.5-3.0), temperature (20.0-22.0 °C) and voltage (5.0-6.0 kV) (Table 1).

**Table 1.** Nominal values corresponding to -1 and +1 in the first experimental design.

Variables	-1	+1
pH	2.5	3.0
Voltage (kV)	5.0	6.0
Temperature (°C)	20.0	22.0

The results of this design were used to plan a subsequent higher order  $2^2$  design with central composite, which was performed with the same procedure. The variables evaluated were temperature (19.6-22.4 °C) and voltage (5.8-7.2 kV) (Table 2). All statistical calculations were developed with the software Statistic, Statsoft Inc., v. 5.5 (USA).

The optimized separation conditions for the streptomycin and oxytetracycline determinations were 0.10 M monobasic monohydrate sodium phosphate at pH 2.5, voltage, 7.0 kV and temperature, 20.0 °C.



**Table 2.** Nominal values corresponding to -1.41, -1, 0, +1 and +1.41 in the second experimental design.

<b>Variables</b>	<b>-1.41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1.41</b>
Voltage (kV)	5.8	6.0	6.5	7.0	7.2
Temperature (°C)	19.6	20.0	21.0	22.0	22.4

## 2.7. Method validation

The method was *in-house* validated using the following performance criteria: linearity and linear range, sensitivity, selectivity, intra-day and inter-day precision, detectability, accuracy and ruggedness. The linearity, linear range, sensitivity and detectability were established through the analytical curves obtained by triplicate analysis of STP and OTC at five concentration levels (20, 60, 100, 140 and 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 10, 60, 110, 160 and 210  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively). The detectabilities for each antibiotic were obtained from three analytical curves and calculated using the following expression:  $D = 3 s_{y/x}/m$ , where  $s_{y/x}$  is the standard deviation of the residuals and  $m$  is the slope of the analytical curve [31].

The intra-day precision of the method, expressed as the relative standard deviation of peak area measurements ( $n=5$ ), was evaluated through the results obtained with the method operating over one day under the same conditions, using solutions of each analyte at a single concentration level: 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for STP and 110  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for OTC. The inter-day precision was determined at the same concentrations levels, and the analyses were performed for 5 days.

The selectivity of the method was evaluated by exposing STP and OTC, at concentration levels of 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for STP and 110  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for OTC, to the following stress conditions: 0.010 and 0.10 M HCl, 0.010 and 0.10 M NaOH, 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  and temperature (55 °C) for one hour and 0.010 M HCl, 0.010 M NaOH, 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  for twenty four hours. The solutions were analyzed considering the resolution between analyte and other substances formed during the experiment

and the analytical signal before and after the exposure of the analyte to the stress conditions, expressed as recovery [32].

The accuracy of the method was evaluated through analyses of samples of bactericidal products containing STP and OTC by the proposed CZE method using the optimized procedure and by HPLC according to the method described in the US Pharmacopeia [33] for OTC. Recovery tests were used for STP.

The susceptibility of the analytical method to changes was tested by evaluating the ruggedness of the method using a 2<sup>2</sup> experimental design (Table 2).

## 2.8. Sample analysis

A proper amount of each formulation from the same batch was weighed into a 50 ml volumetric flask to result in a final concentration of 1 mg ml<sup>-1</sup> and diluted using the dilution buffer (0.010 M disodium hydrogen phosphate, pH = 7.0). The mixture was sonicated for about 5 minutes, allowed to cool, diluted to volume and filtered through 0.45 µm membrane filters Millipore (USA). A proper aliquot was transferred to an autosampler vial. All samples were analyzed in quintuplicate.

The analyses by CZE were carried out as described above and quantitation was accomplished through an external calibration curve with five concentration levels in the range of 20-200 µg ml<sup>-1</sup> (STP) and 10-210 µg ml<sup>-1</sup> (OTC). All samples containing OTC were also analyzed by HPLC using the method described in the US Pharmacopeia [33].

# 3. RESULTS AND DISCUSSION

## 3.1. CZE method development

The running electrolytes recommended in the literature for the determination of OTC by CZE are sodium phosphate (pH = 2.0) or sodium carbonate (pH = 11.2) [25,26] and for STP are sodium tetraborate (pH = 9.0 or 10.25) or sodium dihydrophosphate, boric acid and sodium tetraborate (pH = 6.35) [9,11,22]. Thus, in order to optimize the simultaneous determination of STP and OTC different

compositions of background electrolyte were evaluated: sodium phosphate (pH 2.0 and 8.5), sodium carbonate (pH 8.5 and 10) and sodium tetraborate (pH 9.0).

Using 0.10 M phosphate at pH lower than 4.0 both compounds were separated. At higher pH values STP was not detected until 20 min. The other electrolytes did not separate the two components of the test mixture.

In acidic medium (pH<4.0) the electroosmotic flow is very low and the electrophoretic flow is responsible for the movement of the ions through the capillary. Considering the pK values of OTC (pKa<sub>1</sub> = 3.2, pKa<sub>2</sub> = 7.5 and pKa<sub>3</sub> = 8.9) [34] and the basic character of STP, in pH lower than 4.0, OTC, as well as STP will be protonated, i.e. positively charged and the molecules move as a function of their electrophoretic flows. Due to the differences in the charge/mass ratio, the separation is possible even in the absence of the electroosmotic flow.

For the determination of the most relevant variables, a first experimental design using a 2<sup>3</sup> design was conducted: pH (2.5-3.0), temperature (20.0-22.0 °C), and voltage (5.0-6.0 kV) (Table 1). The highest signals for STP and OTC were obtained at pH 2.5. At pH 2.0 and 3.0 the current produced in the capillary increased during the analysis. The same occurs at pH 4.0 where the signal of the peak of OTC decreased. This study showed that voltage has a significant negative influence. This means that a decrease in voltage improves the signal of the analytes but the migration times become too long. The temperature has a very low positive influence with no influence on migration times. Thus temperature = 21.0 °C and voltage = 6.5 kV as central points for the next plan were chosen.

The next step was the optimization of the concentration of the sodium phosphate electrolyte. Concentrations of 0.020, 0.050 and 0.10 M were evaluated. The best results were obtained using a solution prepared at 0.10 M. At 0.020 and 0.050 M the current obtained was very low, increasing the migration time and decreasing the peak areas.

The analytes were detected at 195 nm. Others wavelengths were also evaluated (200 and 205 nm). However, the sensitivity of STP decreased in comparison to detection at 195 nm.

After establishing the electrolyte composition, concentration and pH, a  $2^2$  central composite design was performed for the two significant variables (temperature and voltage) in order to refine the optimal conditions for the separation of STP and OTC by CZE and to evaluate the ruggedness of the method. The experimental design was thus constructed by the use of a full  $2^2$  factorial design with three central and four axial points ( $\alpha = \pm 1.41$ ). This procedure offers an efficient route for determining the best resolution from a selected number of conditions [35]. The conditions are presented in Table 2.

Figure 2 shows the response surfaces and the influence of the parameters temperature and voltage on the signals for STP and OTC. Due to the great difference between the chemical structures of the STP and OTC, the response surfaces had distinct aspects. The equations of the model are:  $Y = 268.47 - 18.15 X_1 + 4.07 X_2 - 31.42 X_1^2 - 17.23 X_2^2 - 19.50 X_1X_2$  ( $R^2 = 0.9203$ ) for STP and  $Y = 1276.32 + 76.31 X_1 + 139.89 X_2 + 179.27 X_1^2 + 96.10 X_2^2 - 315.00 X_1X_2$  ( $R^2 = 0.8109$ ) for OTC.

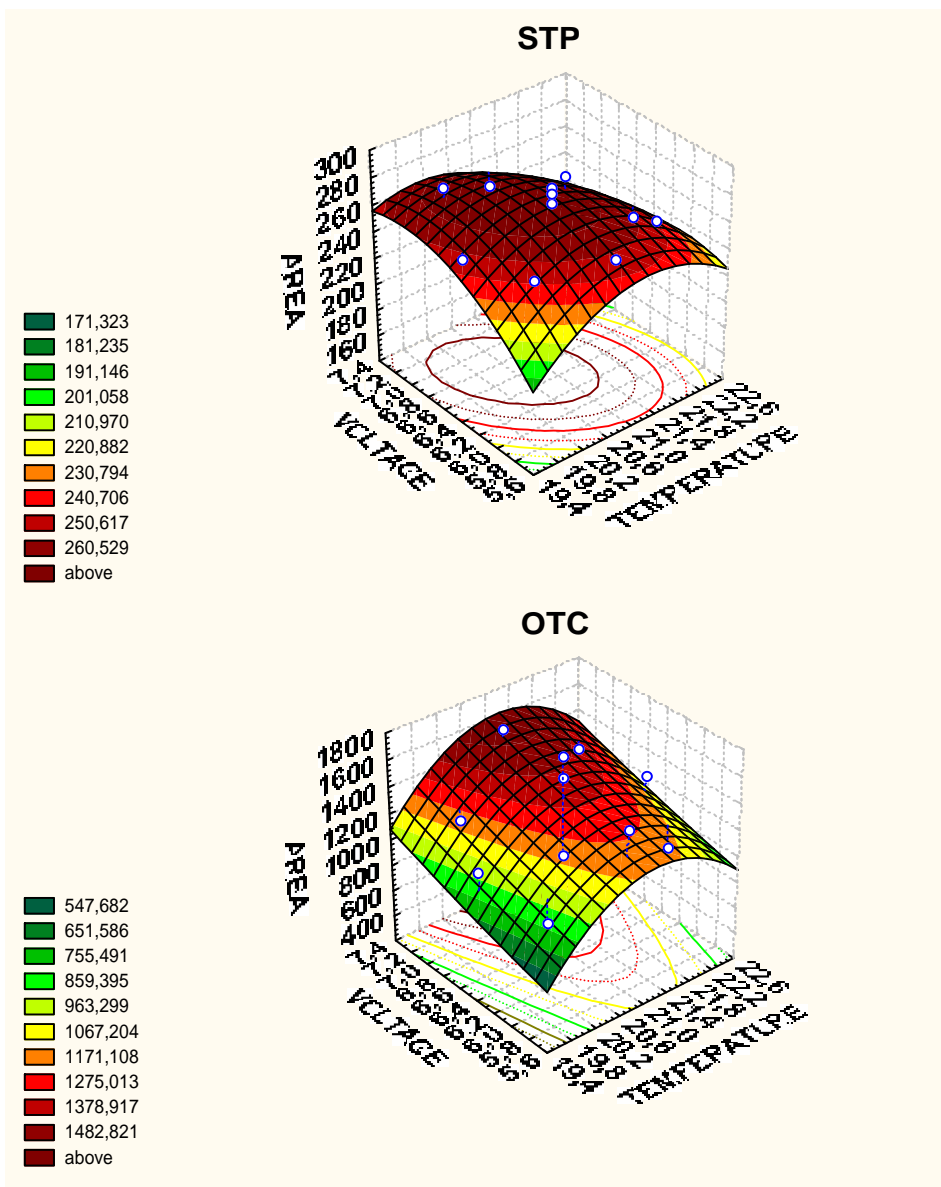


Figure 2- Response surfaces for streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) showing the area as a function of significant parameters voltage (kV) and temperature (°C), obtained using a 2<sup>2</sup> experimental design with central composite design.

Considering the response surfaces, the best conditions for the simultaneous determination of OTC and STP were: running electrolyte: 0.10 M monobasic sodium phosphate, voltage: 7.0 kV, temperature: 20.0 °C and detection: 195 nm.

A typical electropherogram of STP and OTC using the optimized conditions established through the experimental design is presented in Figure 3.

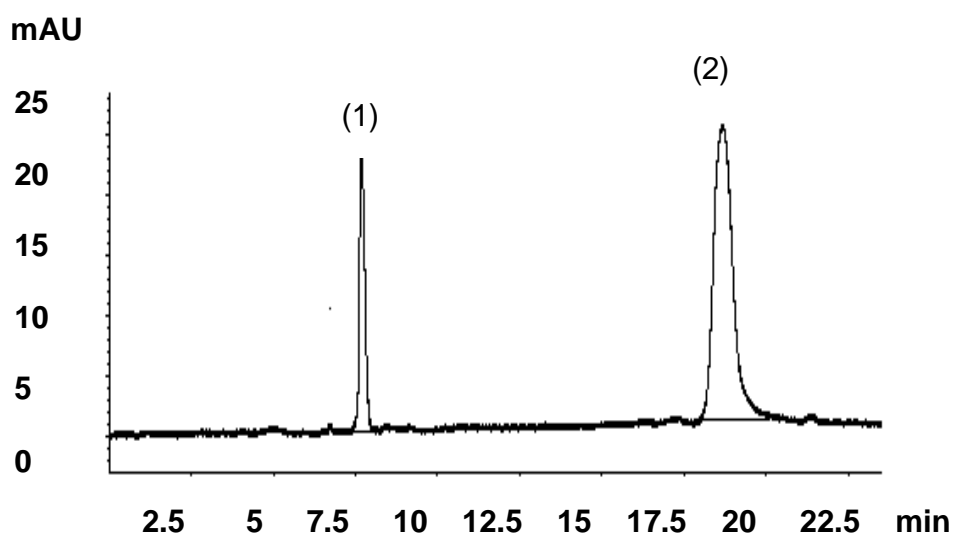


Figure 3- A typical electropherogram of 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of (1) streptomycin and (2) oxytetracycline ( $t_{m1}$  7.7 min and  $t_{m2}$  18.7 min, respectively). Capillary: uncoated fused silica; background electrolyte, a solution of 0.10 M sodium phosphate, pH 2.5; temperature, 20.0 °C; applied voltage, 7.0 kV; detection wavelength, 195 nm.

Before method validation, a system suitability test was performed. This test provides assurance that a system's performance is appropriate for the intended use. The following parameters were evaluated: plate count (N), resolution (Rs), and tailing factor (T). The results of resolution and tailing factor obtained were

within the acceptable range ( $R_s > 2$  and  $T \leq 2$ ), according to Shabir [32]. The results are presented in Table 3.

**Table 3:** System suitability parameters for CZE.

<b>Parameters</b>	<b>STP</b>	<b>OTC</b>
Plate number /m	102276	155087
Resolution (Rs)	2.6	-
Tailing factor (T)	0.92	1.13
Migration time (min)	7.7	18.7

### 3.2. Method validation

The CZE method was *in-house* validated for the analyses of the STP and OTC by evaluation of the following parameters: linear range, linearity, sensitivity, detectability, intra- and inter-day precision. The results are summarized in Table 4. The accuracy was evaluated by comparing the results obtained from the analysis of bactericidal products by the proposed CZE method with those obtained using the recommended HPLC method described in the US Pharmacopeia [33] for OTC. Recovery tests were used to evaluate the accuracy of STP [31,32]. The results are shown in Tables 5 and 6.

The linearity, linear range and sensitivity were obtained from analytical curves at five concentration levels for each analyte under study, with triplicate analyses. The linearity was tested using a pure error lack of fit test with simple regression, which was not significant at the 5% level.

The precision of the method for STP and OTC was evaluated using the results obtained over one day of operation under the same conditions (intra-day) and for 5 days (inter-day). The results are expressed as relative standard deviations (RSD) in Table 4 and were lower than 2.0% for both intra- and inter-day evaluations. Considering that regulatory agencies [31,32,33] recommend that the

precision should be lower than 2%, the values obtained by the CZE method are acceptable.

**Table 4.** Quantitative features for STP and OTC.

Parameter	STP	OTC
Linear range ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	20 - 200	10 - 210
Sensitivity (aU $\mu\text{g}^{-1}$ ml) ( $P < 0.05$ )	10.77	34.76
Linearity ( $r$ )	0.9997	0.9998
Intercept ( $P < 0.05$ )	-50.7	30.7
Intra-day precision, n=5. (RSD %)*	0.22	0.71
Inter-day precision, n=5. (RSD %)*	1.13	1.75
Detectability ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	6	2

(\*) Standard concentration:  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  (STP) and  $110 \mu\text{g ml}^{-1}$  (OTC).  
RSD: relative standard deviation.

The limit of detection represents the lowest concentration of an analyte in sample solutions to be introduced in the CE equipment that can be detected and has been included only to provide information about the detectability of the method. The quantitation limit of the method is not presented, due to the fact that the active compound is the major constituent of the formulations and this parameter is not required for method validation for the quality control of bactericidal products. Furthermore, this limit would depend on sample dilution before analysis.

The selectivity of the method indicates the ability of the method to accurately measure the analyte response in the presence of all potentially interfering sample components or degradation products [32]. In this study the selectivity was evaluated by exposing the analyte to stress conditions, such as temperature, acid, base and an oxidizing medium. The solutions were analyzed considering the



resolution between the analyte and other substances formed during the experiment and the analytical signal before and after exposure of the analyte to the stress conditions. The results are presented in Figure 4. The stability of the analytes depends on their chemical structure and many differences between STP and OTC recoveries were observed. Under the four stressing conditions, OTC was more stable than STP under the same conditions, except for temperature. In some conditions (0.10 M NaOH and 0.10 M HCl for one hour) of this study, STP degrades completely. The degradation products formed under all the stress conditions had migration times significantly different from their corresponding parent analyte, thus confirming the selectivity of the method.

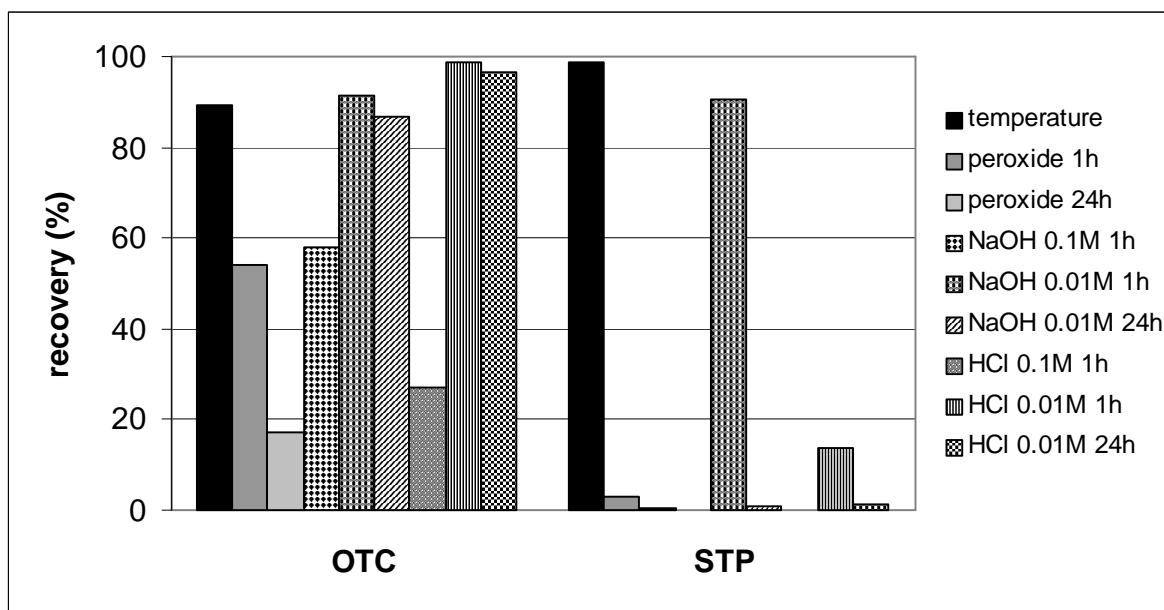


Figure 4- Recoveries (%) of streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) after exposure of standard solutions ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) to temperature ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 0.010 and 0.10 M HCl, 0.010 and 0.10 M NaOH and 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  for one hour and 0.010 M HCl, 0.010 M NaOH and 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  for twenty four hours.

The accuracy of the method was assessed for STP and OTC by analyzing ten samples of two commercial formulations: five commercial samples containing STP and OTC (numbers 1 - 5) and five commercial samples containing only OTC (numbers 6 - 10). All samples were analyzed by the CZE method developed and by the US Pharmacopeia method recommended to detect and quantify OTC. The samples which contained STP in their formulation were also analyzed using recovery tests. The mean values obtained using the proposed and the reference method did not differ significantly ( $P < 0.05$ ) for all samples (Tables 5 and 6). Some of the results obtained for the OTC content in commercial samples, by both CZE and HPLC, were not in compliance with the Pharmacopeia recommendation (not less than 90.0 percent and not more than 110.0 percent of the labeled amount of oxytetracycline hydrochloride) [33]. The nominal values for OTC were 15 and 200  $\text{g kg}^{-1}$  for samples 1 - 5 and 6 - 10, respectively. The amount determined in relation to the labeled amount was in the range of 100.7 to 115.9% (using CZE) and 102.0 to 118.9% (using HPLC). In relation to STP, the Pharmacopeia has not yet included the specific monograph for soluble powder. Nevertheless, the amount determined in relation to the labeled amount (nominal value is 150  $\text{g kg}^{-1}$ ) was 114.3 to 119.2% (using CZE) and 113.8 to 117.7% (after recovery tests).

The ruggedness of the method is assessed when introducing small changes to the procedure and examining the effect on the results (analytical signal). In this study, ruggedness was observed by the counter plot obtained by the  $2^2$  central composite design described in 2.7. The counter plots for STP and OTC are presented in Figure 5. Whereas the analytical signal of STP was less influenced by small variations in temperature and applied voltage, OTC was more affected by small variations in these parameters. In order to guarantee consistent results, it is important that the range of each variable that produces acceptable results be incorporated in the analytical procedure. The results obtained in this study allowed establishing the following parameters: voltage  $7.0 \pm 0.2$  and temperature  $20.0 \pm 0.5$  °C. This small zone of ruggedness is common with electrophoretic methods.

**Table 5.** OTC content determined in commercial samples of bactericidal formulations by CZE and HPLC.

Sample	CZE		HPLC	
	Average content* (g kg <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Average content* (g kg <sup>-1</sup> )	RSD (%)
1	16.0	0.4	16.5	0.4
2	16.1	0.2	16.4	0.1
3	15.1	0.3	15.3	0.1
4	16.2	0.2	16.6	0.1
5	15.4	0.6	15.5	0.2
6	227.8	4.9	231.9	6.0
7	231.9	5.1	232.2	1.3
8	230.7	4.3	237.8	1.0
9	230.2	9.4	228.8	1.8
10	231.7	7.0	229.0	2.1

(\*) n=5; RSD, relative standard deviation.

Nominal value: samples 1-5 = 15 g kg<sup>-1</sup>; samples 6-10 = 200 g kg<sup>-1</sup>.

**Table 6.** STP content determined in commercial samples of bactericidal formulations by CZE and recovery tests.

Sample	CZE		RECOVERY**	
	Average content* (g kg <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Average content* (g kg <sup>-1</sup> )	RSD (%)
1	178.8	5.3	176.6	1.7
2	175.4	6.3	175.7	2.1
3	173.3	1.3	172.2	2.0
4	171.4	2.9	170.7	3.8
5	177.0	4.5	175.5	3.8

(\*) n=5; RSD, relative standard deviation. (\*\*) amount added: 20, 40 and 60 g kg<sup>-1</sup>. Nominal value: samples 1-5 = 150 g kg<sup>-1</sup>.

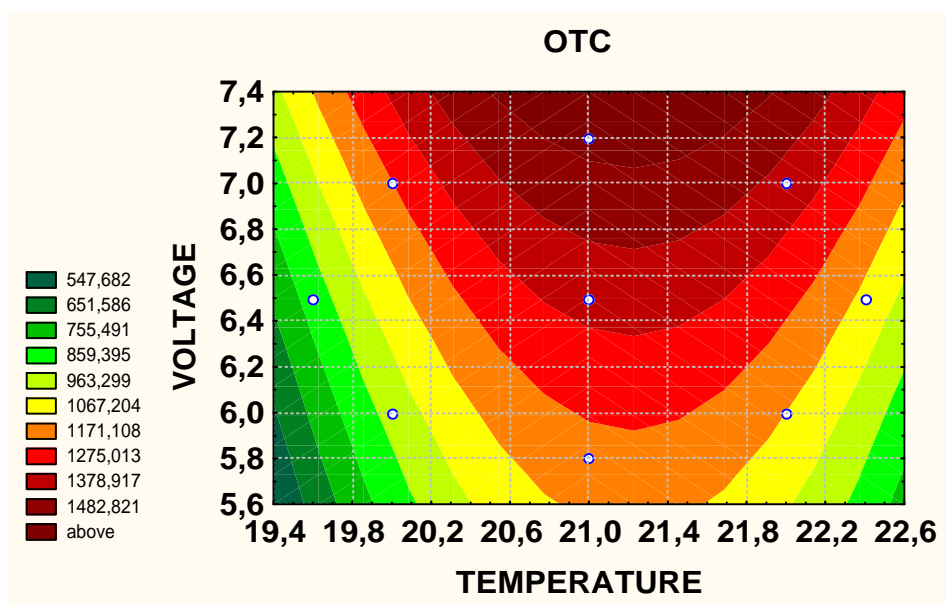
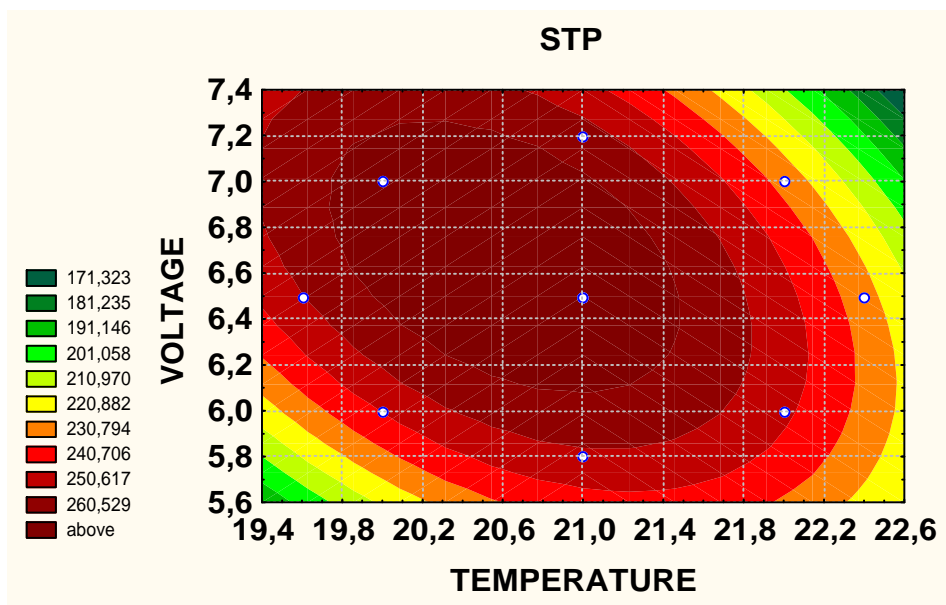


Figure 5- Counter plots for streptomycin (STP) and oxytetracycline (OTC) used to evaluate the ruggedness of the method selected by the  $2^2$  experimental design as a function of significant parameters voltage (kV) and temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ).

#### **4. Conclusions**

This paper describes a relatively simple, rapid and accurate CZE method for the determination of streptomycin and oxytetracycline in bactericidal products to be used in agriculture. This method may offer an alternative to the procedures currently required in the monographs described in the US Pharmacopeia, which recommends analysis by microbial assays that are quite time consuming or HPLC that requires the use of large volumes of HPLC-grade solvents.

The results obtained in this work confirm that the CZE method, when properly optimized and validated, fulfills all the pre-established requirements based on international regulations and is adequate to be used in the quality control of bactericidal products with the advantage that the same method could be used for the simultaneous determination of these structurally different antibiotics streptomycin and oxytetracycline.

#### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support from CAPES and thank Professor C.H. Collins for the language assistance.

#### **REFERENCES**

- [1] J.F. Prescott, J.D. Baggot, Antibacterial therapy in veterinary medicine, Iowa State University Press, Ames, 1993.
- [2] C.C. Bennett, The aminoglycosides, Resident Competition: 1<sup>st</sup> place, University of Florida, 1996.
- [3] WHO, 1997, Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives  
(Available at: [http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec\\_2075.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_2075.htm))  
(Accessed on 21 March 2006).

- [4] M. Hernández, F. Borrul, M. Callul, *Chromatographia* 52 (2000) 279-284.
- [5] L.A. Mitscher, *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics* (Medical Research Series, Vol. 9), Marcel Dekker, New York, 1978.
- [6] PAN Pesticide Action Network, 2005, Pesticides Database.  
(Available at: [http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref\\_products.html#EPAProdPests](http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_products.html#EPAProdPests))  
(Accessed on 21 March 2006).
- [7] Brazil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. Portaria No. 10, 08 March 1985.  
(Available at: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=284&word>)  
(Accessed on 21 March 2006).
- [8] S. Oguri, Y. Miki, *J. Chromatogr. B* 686 (1996) 205-210.
- [9] P. Howalski, I. Oledzka, P. Okoniewski, M. Switala, H. Lamparczyk, *Chromatographia* 50 (1999) 101-104.
- [10] E. Kaale, S. Leonard, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 67-79.
- [11] C.L. Flurer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 809-816.
- [12] M.C. Caturla, E. Cusido, D. Westerlund, *J. Chromatogr.* 593 (1992) 69-72.
- [13] P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 345-351.
- [14] E. Adams, M. Rafiee, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Pharm. Biom. Anal.* 24 (2000), 219-226.
- [15] L.G. McLaughlin, J.D. Henion, *J. Chromatogr.* 591 (1992), 195-206.
- [16] M.J. Salvatore, I. Feygin, S.E. Katz, *Analyst* 118 (1993) 281-287.
- [17] T. Uematsu, R. Sato, A. Mizuno, M. Nishimoto, S. Nagashima, M. Nakashima, *Clin. Chem.* 34 (1988) 1880-1882.
- [18] M. Horie, H. Saito, T. Natori, J. Nagata, H. Nakazawa, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 27 (2004) 863-874.
- [19] M. van Bruijnsvoort, S.J.M. Ottink, K.M. Jonker, E. de Boer, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 137-142.
- [20] MERCK Index, 12 ed., Rahway, 1996, pp.1505, 1197.
- [21] M. Hernández, F. Borrul, M. Callul, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416-427.

- [22] Y.M. Li, D. Debremaeker, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 23 (2000) 2979-2990.
- [23] M.T. Ackermans, F.M. Everaerts, J.L. Beckers, *J. Chromatogr.* 606 (1992) 229-235
- [24] S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1541-1547
- [25] T.S. Huang, W.X. Du, M.R. Marshall, C.I. Wei, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2602-2605.
- [26] M. Hernández, F. Borrul, M. Callul, *Chromatographia* 54 (2001) 355-359.
- [27] J. Tjørnelund, S.H. Hansen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1077-1082.
- [28] A. Van Schepdael, I. Van den Bergh, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A.* 730 (1996) 305-311.
- [29] L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 89-94.
- [30] Y.-M. Hsiao; J.-L. Ko; C.-C. Lo, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1669-1674.
- [31] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, *Quím. Nova*, 27 (2004) 771-780.
- [32] G.A. Shabir, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 57-66.
- [33] The United States Pharmacopeia. *The National Formulary*. 28th ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2005, p. 1451.
- [34] C.R. Anderson, H.S. Rupp, W. Wu, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 23-32.
- [35] B.B. Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns (Ed.), *Como fazer experimentos*, 2<sup>a</sup> ed., Editora UNICAMP, Campinas, 2001.



## **CAPÍTULO 3**

### **DETERMINATION OF OXYTETRACYCLINE IN TOMATOES BY HPLC USING FLUORESCENCE DETECTION**

**Trabalho enviado para publicação na revista *Food Chemistry* (em processo de revisão)**



# DETERMINATION OF OXYTETRACYCLINE IN TOMATOES BY HPLC USING FLUORESCENCE DETECTION

## ABSTRACT

An analytical method for the determination of oxytetracycline (OTC) in tomatoes was developed and validated. Liquid-liquid extraction (LLE) and a solid-phase extraction (SPE) were used for sample preparation. Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a C<sub>18</sub> column and a mobile phase containing MeOH : calcium chloride, disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and sodium acetate, pH 7.3 (30:70, v/v), with fluorescence detection at 390 nm excitation and 512 nm emission, was used for separation and quantitation of OTC. The method was validated through the following performance criteria: linearity and linear range, sensitivity, selectivity, intra-day and inter-day precision, detection and quantitation limits and accuracy. Limit of quantitation show that the method developed is suitable for the determination of OTC at a level below the maximum residue limits established by the Brazilian legislations (250 µg kg<sup>-1</sup>). Of 40 samples analyzed, none contained OTC above the limit of quantitation.

**Key words:** Tomatoes, antibiotics, oxytetracycline, method validation, high performance liquid chromatography.

## 1. INTRODUCTION

Antibiotics are the most important bioactive and chemotherapeutic compounds made by microbiological synthesis. They also include antimicrobial compounds present in higher plants and animals. They have proven their significance in varied fields like medicinal chemistry, agriculture and food industry (Kreuzig, 1996). Oxytetracycline (OTC) is a member of tetracyclines family, a group of clinically important natural products and semi-synthetic derivatives

characterized by a broad spectrum of activity against pathogenic microorganisms, including gram-positive and gram-negative bacteria and protozoa. These compounds are bacteriostatic antibiotics that act by inhibiting the formation of proteins within the bacterial cell. They are used to control bacterial infections in humans and animals and have also found applications in preserving harvest fruits and vegetables, exterminating insect pests and supplementing animal feed. OTC is produced industrially through fermentation by *Streptomyces rimosus* (Hernández, Borrul & Callul, 2003; Mitscher, 1978).

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is an important vegetable crop and is prone to a number of bacterial diseases, among which bacterial canker disease caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* is one of the most important. Bacterial canker symptoms include vascular wilt, leaf spots and fruit spots. The pathogen attacks other economically important crops including pepper and tobacco (Umesha, 2006).

Some countries, including the United States and Brazil, allow the use of OTC in agriculture as fungicide and bactericide to protect crops against pests (Brasil, 1985; EPA, 2005). Nevertheless, even when applied legally, many antimicrobials leave residues in or on treated food such as fruits, vegetables, grains and other commodities. These residues may remain in both fresh produce (like apples or tomatoes) and processed foods (like applesauce or tomato ketchup). In an attempt to address the health issues associated with consumption of these residues, the regulatory agencies set tolerance, or maximum residue limits (MRLs), on the amount of antimicrobial residue that can lawfully remain in or on each treated food commodity.

The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives and Contaminants (JECFA), at its 50<sup>th</sup> Meeting, 1998, established an acceptable daily intake (ADI) of 0-0.03 mg kg<sup>-1</sup> body weight for the tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline) alone or in combination. The Committee also recommended maximum residue limits (MRLs) in foods derived from animal species (cattle, pigs, sheep, poultry fish and giant prawn (*Penaeus monodon*)) (WHO, 1998). The MRLs

recommended by JECFA have been adopted by the Codex Alimentarius Commission (Codex, 2005). In Brazil, the use of OTC is permitted in the following crop species: tomato, potato, beans, cucumber, coffee, peach, plum, passion fruit and pepper. The maximum residue limit (MRL) established is  $0.25 \text{ mg kg}^{-1}$  for all commodities, except for plum (MRL  $0.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Brasil, 1985).

The Environmental Protection Agency of the United States (US/EPA) has established tolerances for residues of oxytetracycline in or on peach and pear (MRL  $0.35 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (EPA, 2005).

According to Oka, Ito & Matsumoto (2000), the widespread utilization of tetracyclines leads to an increasing resistance factor, therefore an accurate monitoring by public health agencies and a precise chromatographic analytical method have been required.

Tetracyclines can be successfully determined in various biological matrices, using high performance liquid chromatography (HPLC) in the reverse-phase mode, with different detection modes, such as spectrophotometry, fluorescence and mass spectrometry. The UV detection has low detectability, while mass spectrometry still requires costly instruments. In general, fluorescence detection is sensitive and selective. OTC is known to form chelate complexes with metal ions and the use of chelating agents, such as EDTA and McIlvaine buffer, a mixture of citric acid and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , to extract OTC from food is commonplace. Microbiological assays are also commonly used for the measurement of tetracyclines in foods, but they are time consuming and their precision appears to be variable (Oka et al., 2000).

The aim of the present study was to develop and validate an analytical method for the determination of OTC in tomatoes by using HPLC with fluorescence detection. The method was applied for the determination of OTC residues in tomatoes purchased from local markets in Alfenas, MG and Mogi Guaçu, SP, Brazil.

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 2.1. Apparatus

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ATvp (Kyoto, Japan) gradient system equipped with a Shimadzu SIL-10AF (Kyoto, Japan) auto injector with a 50  $\mu\text{L}$  loop. The column oven used was a Shimadzu CTO-10ASvp (Kyoto, Japan) operated at 20°C and the flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phase was degassed using a ultrasonic bath (Unique, São Paulo, Brazil). The fluorescence detector was a Shimadzu RF-10Axl (Kyoto, Japan) at 390 nm excitation and 512 nm emission wavelengths. Data acquisition and treatment was performed by a chromatography data system Class-VP (Shimadzu). A BDS Hypersil C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  column (150 mm x 4.6 mm i.d.) and a similar pre-column (4 mm x 4.6 mm i.d.) from Thermo (Bellefonte, USA) were used for the separation. Vortex mixer used was Certomat MV from B. Braun Biotech International (Melsungen, Germany). Measurements of pH were made with a model NT PH2 pH-meter from Nova Técnica (São Paulo, Brazil), using a combined glass electrode. For solid phase extraction, octadecyl cartridges C<sub>18</sub> (500 mg/3 mL) from UnitechUSA (Medley, USA) and CRS (Louisville, USA) and a Visiprep DL vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, USA) with 12 ports model were employed.

### 2.2. Standards and reagents

Standards of oxytetracycline hydrochloride and tetracycline hydrochloride were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Analytical reagent grade sodium acetate, calcium chloride, disodium EDTA, citric acid, disodium hydrogen phosphate, hydrogen peroxide, sodium hydroxide, hydrochloride acid were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade methanol was purchased from J. T. Baker (Philipsburg, USA) and n-hexane analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Throughout the study, water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (São Paulo, Brazil). Before analysis, the mobile phase was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter from Millipore (São Paulo, Brazil) under

vacuum. The McIlvaine buffer (pH 4.0) and Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 4.0 and 8.0) solutions were weekly prepared as previously described (Pena, Lino & Silveira, 1999).

### 2.3. Samples

A total of forty samples of tomatoes belonging to the cultivars of the group Santa Cruz (n=15), Salada (n=10) and Saladinha (n=15) were purchased from local markets in Alfenas, MG, and Mogi Guaçu, SP, Brazil, in March and April 2006. All the samples were taken in accordance with the guidelines of the Commission Directive (2002) and weighed at least 1 kg and consisted of at least ten individual pieces of fruit. All samples were put into plastic bags and transported to the laboratory, where they were immediately subjected to analysis.

Antibiotic-free tomatoes samples used in the method validation were obtained from tomatoes grown in open field in Alfenas, MG.

### 2.4. Standard solutions

Stock solutions (1 mg mL<sup>-1</sup>) of OTC and tetracycline (TC) were prepared by dissolving 10 mg in 10 mL of methanol. They were kept in brown glass vials in the freezer (-18 °C) and were stable at least 2 months. Working standard solutions in the concentration of 10 µg mL<sup>-1</sup> were prepared daily by dilution of stock solutions in methanol to appropriate concentrations. These solutions were prepared immediately before use.

### 2.5. Cleanup and extraction procedure

The tomatoes of each sample (1 kg) was chopped, triturated and homogenized in a blender, sifted and a portion of 1 g was weighed and placed into a glass tube and dissolved in 10 mL of 0.10 M Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 8.0). The sample solution was shaken for 3 min in a vortex mixer at high speed. After filtration through a Buchner funnel, the sample was submitted to liquid-liquid extraction (LLE) with 10 mL of hexane in a separatory funnel. The aqueous phase

was adjusted to the pH 4.0 with citric acid 0.5 M and was applied to a C<sub>18</sub> SPE cartridge, 500 mg/3 mL. This cartridge was previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 4.0). Then, the cartridge containing the sample was washed with 3 mL of McIlvaine buffer (pH 4.0) : methanol (85:15, v/v). The OTC and TC were eluted with 3 mL of methanol. The eluate was concentrated to dryness under nitrogen at 40°C and the residue was dissolved in 100 µL of the mobile phase. The final eluate was filtered through a 0.45 µm membrane filters Millipore (São Paulo, Brazil) and stirred in vortex before injecting into the chromatograph. An aliquot of 50 µL was injected.

## 2.6. HPLC procedure

The separation conditions for the oxytetracycline and tetracycline were a mobile phase flow 0.8 mL min<sup>-1</sup> containing a aqueous solution 0.035 M calcium chloride, 0.025 M disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and 0.075 M sodium acetate buffered to pH 7.3 and methanol (70:30, v/v) filtered through a 0.45 µm nylon filter under vacuum and degassed by ultrasonication. Oven temperature was 20°C and operated at an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 512 nm. The autosampler was set to inject 50 µL aliquots of samples. The quantitation was accomplished through an internal analytical curve with six concentration levels in the range of 100-350 µg kg<sup>-1</sup> (OTC) and 250 µg kg<sup>-1</sup> (TC) as internal standard. Extraction recoveries were determined spiking antibiotic-free fresh tomatoes samples (1 g) with a fortification solution at three different levels: 150, 250 and 350 µg kg<sup>-1</sup>.

## 2.7. Method validation

The method was *in-house* validated using the following performance criteria: linearity and linear range, sensitivity, selectivity, intra-day and inter-day precision, detection and quantitation limits and accuracy. The solutions for calibration and fortification were prepared in methanol and stored at -18°C. Linearity, linear range,



sensitivity and detection and quantitation limits were established through the analytical curves obtained by quintuplicate analysis of OTC at six concentration levels (100, 150, 200, 250, 300 and 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). The internal standard used was TC in the concentration level of 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were obtained from three analytical curves and calculated using the following expression:  $\text{LOD} = 3 \sigma/s$  and  $\text{LOQ} = 10 \sigma/s$  where  $\sigma$  is the standard deviation of the response and  $s$  is the slope of the analytical curve (ICH, 1996).

The intra-day precision of the method, expressed as the relative standard deviation of peak area measurements ( $n=5$ ), was evaluated through the results obtained with the method operating over one day under the same conditions, using three different fortification levels: 150, 250 and 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The inter-day precision was determined at the same concentrations levels, and the analyses were performed for 5 days (Brasil, 2003; Ribani, 2004).

The selectivity of the method was evaluated by exposing OTC and TC at a concentration level of 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , to the following stress conditions: 0.010 and 0.10 M HCl, 0.010 and 0.10 M NaOH, 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  and temperature (55  $^\circ\text{C}$ ) for one hour and 0.010 M HCl, 0.010 M NaOH, 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  for twenty four hours. The solutions were analyzed considering the resolution between analyte and other substances formed during the experiment and the analytical signal before and after the exposure of the analyte to the stress conditions, expressed as recovery (Shabir, 2003).

The accuracy of the validated method was determined as percent recovery, at three different fortification levels: 150, 250 and 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Brasil, 2003; Shabir, 2003; Ribani, 2004).

## 2.8. Stability studies

To evaluate the stability of OTC in the matrix, a stability study was performed in a tomato sample grown in open field in which the antibiotic was applied. The

plants were subjected to treatment with a commercial product which contains in its commercial formulation the active ingredient oxytetracycline at the concentration of 200g kg<sup>-1</sup>. The dose employed was 2.0 kg ha<sup>-1</sup>. The amount to be delivered per plant was calculated according the manufacturer and was based on the amount of bactericide that is generally recommended per acre. One day after the application, the tomato sample was carried to the laboratory and it was analysed over one week period (Brasil, 2003; Ribani, 2004).

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. HPLC conditions optimization**

Some authors (Iwaki, Okumura & Yamazaki, 1992; Houglum, Larson & Knutson, 1997) recommended the use of a mobile phase containing calcium chloride, EDTA and sodium acetate buffer in order to result a highly sensitive HPLC method for the determination of OTC and TC with fluorimetric detection. CaCl<sub>2</sub> is used to produce the fluorescent chelate and EDTA is used to prevent quenching of the fluorescence response by the column.

To optimize the HPLC conditions, the effects of the concentration and the proportion of each additive in the mobile phase, pH and column temperature were investigated. The maximum fluorescence intensity of OTC and TC were obtained with a mobile phase containing an aqueous solution 0.035 M calcium chloride, 0.025 M EDTA and 0.075 M sodium acetate, pH 7.3 and methanol (70:30, v/v). The mobile phases were tested in the pH range of 6.5 to 7.3 and column temperature in the range 20 to 40°C. The isocratic analysis under the conditions described allows the separation of OTC and TC with good resolution at flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>.

#### **3.2. Cleanup and extraction optimization**

For solid-phase extraction, initial extractions were carried out using pH 4.0 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer, a mild acidic solvent containing EDTA, which is most

commonly used for extraction of tetracyclines from foods. The cleanup efficiencies were studied to adjust the following parameters: the type of cleanup cartridge, the solvents used in the washing steps, the eluent solvent and the volumes for eluting tetracyclines from the cartridge. A number of experiments were then conducted to optimize the extraction recoveries. In order to find the most efficient cleanup method for OTC in tomato, two different commercial octadecyl cartridges C<sub>18</sub> were compared. In addition, different proportions of the washing solution (McIlvaine buffer pH 4.0:methanol) in the following proportions such as 80:20, 85:15; 90:10 (v/v) were studied. The hydrogenionic concentration of the Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 4.0 and 5.0) used to conditioning the cartridge was also evaluated. Methanol was chosen to elute the tetracyclines.

Very low recoveries were obtained with these experiments, so a LLE was added to the procedure before the SPE in order to remove some nonpolar compounds of the matrix. Considering the pK values of OTC (pK<sub>a1</sub> = 3.2, pK<sub>a2</sub> = 7.5 and pK<sub>a3</sub> = 8.9) (Anderson, 2005), in pH 8.0, OTC will be charged and only the nonpolar compounds will be extract by the nonpolar solvent. Thus, 1 g of chopped and sieved tomato was dissolved in 10 mL of 0.10 M Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 8.0). The solution was shaken for 3 min and a LLE with hexane in a separatory funnel for 3 min was conducted. The aqueous phase was taken and the pH adjusted to 4.0. Then, the aqueous extraction phase was applied to a previously conditioned cartridge. The same test were performed with ethyl acetate instead hexane in the LLE procedure. Best results were obtained when hexane was used and the values for recoveries were higher than 70% in fortified samples. One of the two commercial octadecyl cartridges evaluated was chosen because it presented the best results for recovery (> 90.0%).

Figure 1 shows chromatograms of the extracts from (a) blank and (b) spiked tomatoes at fortification level 250 µg kg<sup>-1</sup> for OTC and TC using the optimized HPLC conditions.

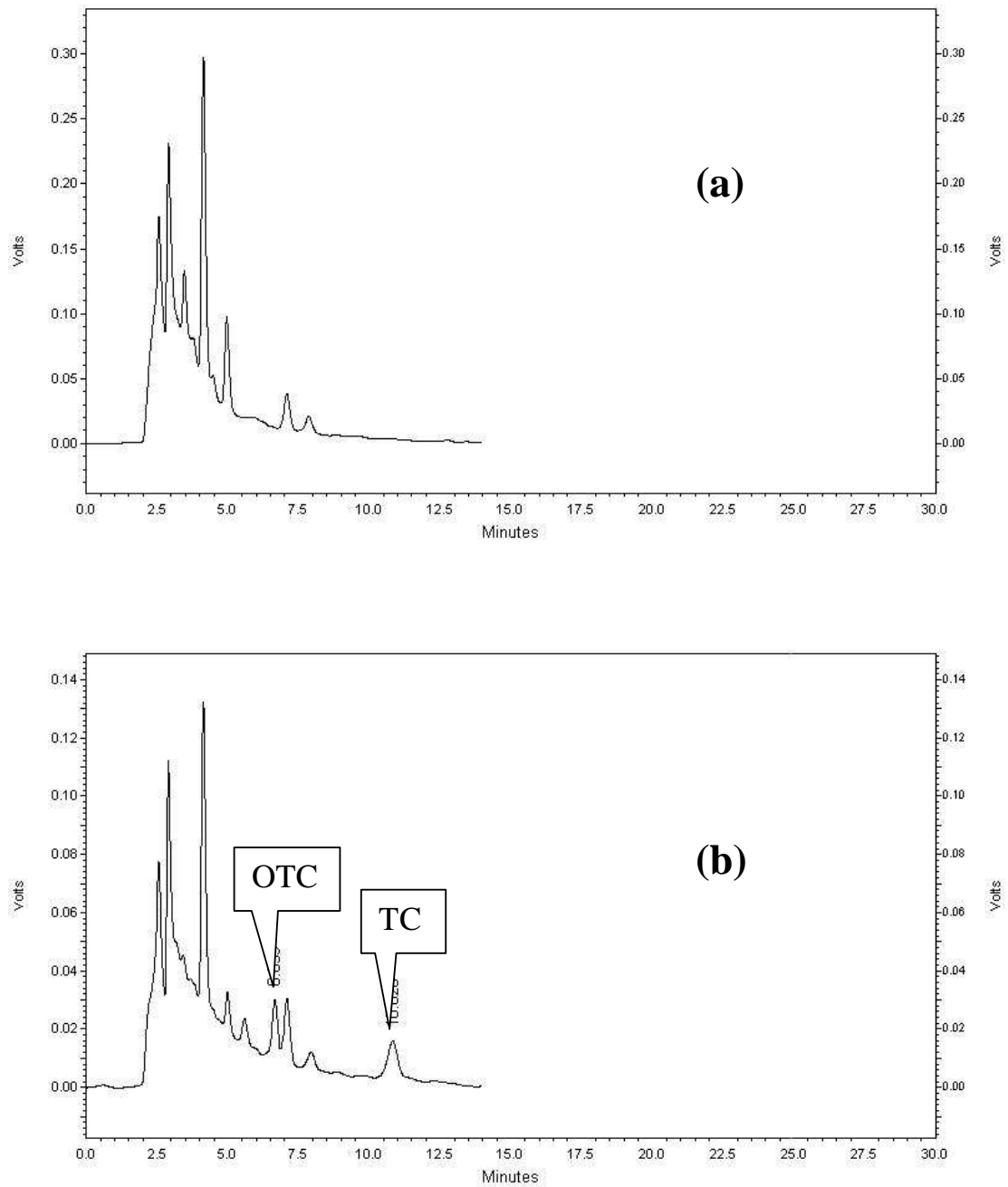


Figure 1- Chromatograms of the extracts from (a) a known negative tomato sample and (b) spiked tomatoes at fortification level of  $250 \mu\text{g kg}^{-1}$  for OTC and TC using the optimized HPLC conditions. Mobile phase: 0.035 M calcium chloride, 0.025 M

EDTA and 0.075 M sodium acetate buffer at pH 7.3 and methanol (70:30, v/v); oven temperature 20 °C, flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Retention times of OTC and TC: 6.6 and 10.8 min, respectively.

Before analytical method validation, a system suitability test was performed. The following parameters were evaluated: plate count (N), resolution (Rs), and tailing factor (T). The results of resolution and tailing factor obtained were within the acceptable range ( $R_s > 2$  and  $T \leq 2$ ), according to Shabir (2003). Results are presented in Table 1.

### 3.3. Analytical method validation

The HPLC method was *in-house* validated for the quantitation of OTC in tomatoes by evaluation of the following parameters: linear range, linearity, sensitivity, detection and quantitation limits, intra- and inter-day precision. The results are summarized in Table 2.

The correlation coefficient, linear range and sensitivity were obtained from analytical curves using an internal standard (TC) at six concentration levels for the OTC, with quintuplicate analyses. The linearity was tested using a pure error lack of fit test with simple regression, which was not significant at the 5% level.

The precision of the method for OTC was evaluated using the results obtained over one day of operation under the same conditions (intra-day) and for 5 days (inter-day). The results are expressed as relative standard deviations (RSD) and are shown in Table 2. Considering that regulatory agencies (Brasil, 2003; GARP, 1999) recommend that the precisions should be up to 15%, the values obtained by the HPLC method are acceptable for both intra- and inter-day evaluations.

**Table 1:** System suitability parameters for HPLC.

Parameters	OTC	TC
Plate number /m	40800	31400
Resolution* (Rs)	8.6	-
Tailing factor (T)	1.0	1.0
Retention time (min)	6.6	10.8

(\*) The resolution was calculated between OTC and TC peaks.

The selectivity of the method indicates the ability of the method to accurately measure the analyte response in the presence of all potentially interfering sample components or degradation products (Shabir, 2003). In this study the selectivity was evaluated by exposing the analyte to stress conditions, such as temperature, acid, base and an oxidizing medium. The solutions were analyzed considering the resolution between the analyte and other substances formed during the experiment and the analytical signal before and after exposure of the analyte to the stress conditions. The results are presented in Figure 2. The stability of the analytes depends on their chemical structure and some differences between OTC and TC recoveries were observed. In some conditions (3% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for twenty four hours) of this study, TC degrades almost completely. The degradation products formed under all the stress conditions had retention times significantly different from their corresponding parent analyte, thus confirming the selectivity of the method.

The accuracy of the method was evaluated through recovery test by the analysis of spiked samples with OTC. It was determined as percent recovery and the tomatoes were spiked at different levels: 150, 250 and 350 µg kg<sup>-1</sup>. This parameter was calculated in agreement with Ribani (2004). The results are shown in Table 3.

**Table 2.** Quantitative features for OTC.

Parameter	OTC
Linear range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	100 - 350
Sensitivity (Volts $\mu\text{g}^{-1}$ kg) ( $P < 0.05$ )	0.0034
Correlation coefficient ( $r$ )	0.9991
Intercept ( $P < 0.05$ )	-0.0319
Intra-day precision, $n=5$ , (RSD %)*	
fortified at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$	5.9
250 $\mu\text{g kg}^{-1}$	5.2
350 $\mu\text{g kg}^{-1}$	6.5
Inter-day precision, $n=5$ , (RSD %)*	
fortified at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$	8.6
250 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10.8
350 $\mu\text{g kg}^{-1}$	11.9
LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	10
LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	30

RSD: relative standard deviation.

$n$  = number of replicates.

LOD: limit of detection and LOQ: limit of quantitation.

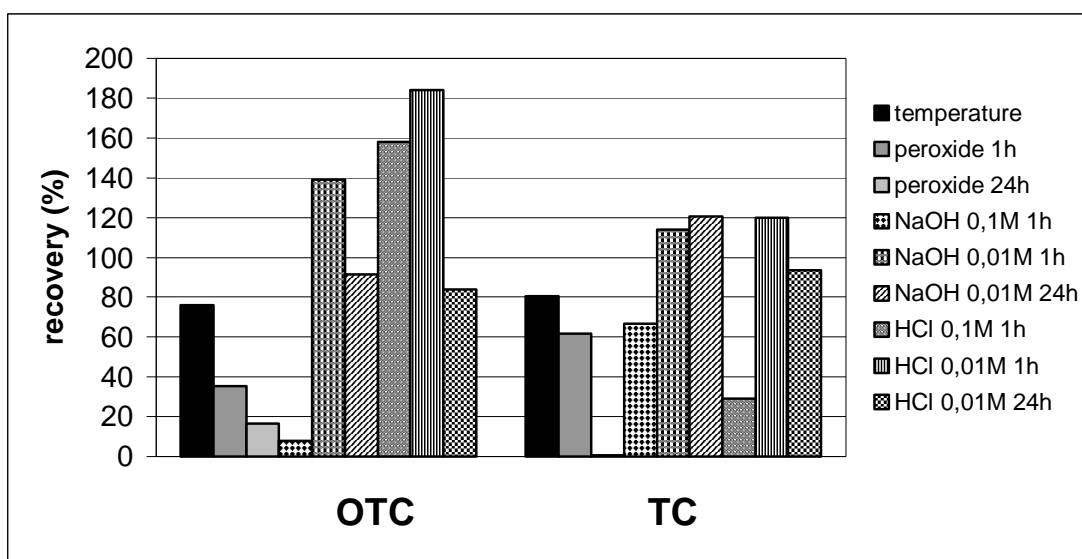


Figure 2- Recoveries (%) of oxytetracycline (OTC) and tetracycline (TC) after exposure of standard solutions ( $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) to temperature ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 0.010 and 0.10 M HCl, 0.010 and 0.10 M NaOH and 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  for one hour and 0.010 M HCl, 0.010 M NaOH and 3% v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$  for twenty four hours.

**Table 3:** Oxytetracycline levels (n=5) in tomato extracts.

Spiking level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recovery mean, %	RSD (%)*
150	98.0	5.8
250	97.9	7.8
350	101.9	6.6

RSD: relative standard deviation.  
n = number of replicates.



### 3.4. Stability and application to real samples

To check the stability of purified extracts of tomato samples, they were analyzed and stored at 4°C. Then they were reanalyzed also over one week period. The results of OTC levels in tomatoes obtained by stability studies shown that the analytes were stable on the tomato extract until the third day. The results are summarized in Table 4.

**Table 4:** Oxytetracycline levels (n=3) in tomato extracts analysed over one week period.

Day	oxytetracycline level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	RSD (%)*
1	292	8.4
2	289	7.6
3	284	7.9
4	153	5.5
5	127	5.2
6	111	6.3
7	95	5.1

RSD: relative standard deviation.  
n = number of replicates.

Finally, the HPLC method validated was applied to the determination of OTC in tomato real samples purchased from local markets over different days. A total of forty samples were analyzed and none of these samples showed contamination of OTC at detectable levels.

#### 4. CONCLUSIONS

The present paper describes a HPLC method for the determination of oxytetracycline in tomatoes. This method is an accurate and reproducible alternative to the microbial assays that are time consuming. The fluorescence detection is significantly more selective than UV detection and can be used to detect low levels of OTC without additional steps to concentrate the sample.

The results obtained in this work confirm that the HPLC method, when properly optimized and validated, fulfills all the pre-established requirements based on international regulations and show satisfactory recovery values, repeatability and reproducibility and is sensible and specific enough.

The combination of LLE and SPE provides a powerful tool for the determination of OTC residues in fruit and vegetables and the method developed is adequate to detect the antibiotics at concentrations below the LMR established by the Brazilian legislation.

#### Acknowledgements

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

#### REFERENCES

- Anderson, C.R., Rupp, H.S., Wu, W. (2005). Complexities in tetracycline analysis - chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075, 23-32.
- Brasil, 1985. MS/ANVISA Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria No. 10, 08 March 1985 [internet]. Available from: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=284&word=> (Accessed 2007 January 08).

Brasil, 2003. MS/ANVISA Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução No. 899, 29 May 2003 [internet]. Available from: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=> (Accessed 2007 January 08).

Codex, 2005. Codex Alimentarius: Veterinary Drug Residues in Food [internet]. Available from: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/45/MRL2\\_e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/45/MRL2_e.pdf) (Accessed 2007 January 08).

Commission Directive 2002/63/EC of 21 July establishing Community methods of sampling for the official control of pesticides residues in and on products of plant and animal origin [internet]. Available from: [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l\\_187/l\\_18720020716en00300043.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l_187/l_18720020716en00300043.pdf) (Accessed 2007 January 08).

EPA, 2005. U.S. Environmental Protection Agency [internet]. Available from: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_05/40cfr180\\_05.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_05/40cfr180_05.html) (Accessed 2007 January 08).

GARP (1999). Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos* (apostila).

Hernández, M., Borrul, F., Callul, M. (2003). Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 416-427.

Houglum, J.E., Larson, R.D., Knutson, A. (1997). Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 80, 961-965.

International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1996.

Iwaki, K., Okumura, N., Yamazaki, M. (1992). Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 623, 153-158.

Kreuzig, F. (1996). Antibiotics in Hand book of TLC. In: J. Sherma, B. Fried, editors. Marcel Dekker, New York, p.445.

Mitscher, L.A. (1978). The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics (Medical Research Series, Vol. 9), Marcel Dekker, New York.

Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882, 109-133.

Pena, A.L.S., Lino, C.M., Silveira, M.I.N. (1999). Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using postcolumn derivatization with fluorescence detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 82, 55-60.

Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C. (2004) Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.

Shabir, G.A. (2003). 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*, 987, 57-66.

Umesha, S. (2006). Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*, 25, 375-381.

WHO, 1998. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series No. 41 [internet]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je07.htm> (Accessed 2007 January 08).

## **CAPÍTULO 4**

### **RESIDUE CONTENT OF OXYTETRACYCLINE APPLIED ON TOMATOES GROWN IN OPEN FIELD AND GREENHOUSE**

**Trabalho enviado para publicação na revista *Food Control* (em processo de  
revisão)**



## RESIDUE CONTENT OF OXYTETRACYCLINE APPLIED ON TOMATOES GROWN IN OPEN FIELD AND GREENHOUSE

### ABSTRACT

A study was undertaken to evaluate the decline of the residues of oxytetracycline (OTC) in tomatoes grown in two different cultivation systems: open field (conventional cultivation) and greenhouse (protected cultivation). Tomato plants were subjected to a single chemical treatment, when fruits were at the breaker stage of maturation, by applying a commercial formulation at the doses recommended by the manufacturer. Fruit samples provided from open field and greenhouse were simultaneously and periodically taken until the end of the pre-harvest interval and submitted to analysis. A liquid-liquid extraction (LLE) and a silica-based C<sub>18</sub> (octadecyl) solid-phase extraction (SPE) were used for sample preparation. High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection was used to determine the OTC residues. Results showed that the recommended pre-harvest interval, indicated on the prospectuses of manufacturer, lowered the residues levels to acceptable legal limits and no statistical differences were observed between the cultivation systems in relation to the residue levels of OTC.

**Key words:** Tomatoes, antibiotics residue, oxytetracycline, greenhouse, open field.

### 1. INTRODUCTION

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) belongs to the *Solanaceae* family and is an important vegetable crop worldwide. In Brazil, during 2005, it was harvest on 58,385 ha and the production was 3.3 million tonnes, with a productivity of 56,58 tonnes ha<sup>-1</sup> (1). Tomatoes, aside from being tasty are nutritious as they

are, among other nutrients, a good source of vitamins A and C. Cooked tomatoes and tomatoes products are the best source of lycopene, which is a very powerful antioxidant and helpful in preventing the development of many forms of cancer. Hence, this crop is gaining importance both in developing and developed countries and efforts are being made for the quality and quantity production of this commodity (2).

Tomato is a rapidly growing crop with a growing period of 90 to 150 days. It is a daylength neutral plant. Optimum mean daily temperature for growth is 18 to 25°C with night temperatures between 10 and 20°C. Larger differences between day and night temperatures, however, adversely affect yield. The crop is very sensitive to frost. Temperatures above 25°C, when accompanied by high humidity and strong wind, result in reduced yield. Night temperatures above 20°C accompanied by high humidity and low sunshine lead to excessive vegetative growth and poor fruit production. High humidity leads to a greater incidence of pests and diseases and fruit rotting. Dry climates are therefore preferred for tomato production and the plant can be grown on a wide range of soils but a well-drained, light loam soil with pH of 5 to 7 is preferred. Waterlogging increases the incidence of diseases such as bacterial wilt (3).

Plant diseases caused by bacteria are factors that affect tomato production throughout the world. Tomato is prone to a number of bacterial diseases, among which bacterial canker disease caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* is one of the most important. Bacterial canker symptoms include vascular wilt, leaf spots and fruit spots. Bacterial spot, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and bacterial speck, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cause similar foliar symptoms. Nearly 100 % crop loss can occur (4,5).

Bacterial diseases are difficult to control and may be introduced with transplants and, occasionally, have been associated with seed. Various measures have been suggested to manage them and include the use of certified disease-free seeds, resistant cultivars healthy transplants, disinfection and management of infectious disease agents and use of biocontrol agents. The chemical protection of



tomatoes is commonly carried out by scheduled treatments, using applications of copper or agricultural antimicrobials (5,6).

Oxytetracycline (OTC) is a member of the family of the tetracyclines and is used to control microbial infections in humans and animals and have also found applications in preserving harvest fruits and vegetables (7).

Even when applied legally, many antimicrobials may leave residues in or on treated food such as fruits, vegetables, grains and other commodities. These residues may remain in both fresh produce (like apples or tomatoes) and processed foods (like applesauce or tomato ketchup). In an attempt to address the health issues associated with consumption of these residues, the regulatory agencies set tolerance, or maximum residue limits (MRLs), on the amount of the antimicrobial residue that can lawfully remain in or on each treated food commodity. When these compounds are applied according to good agricultural practices, MRL are not exceeded, but their incorrect applications may leave harmful residues, which involve possible health risk and environmental pollution (8).

The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives and Contaminants (JECFA), at its 50th Meeting (1998), established a group acceptable daily intake (ADI) of 0-0.03 mg kg<sup>-1</sup> body weight for oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. No MRLs were recommended for foods of vegetable origin (9). Tolerances were established in the USA by the Environmental Protection Agency (EPA) for residues of oxytetracycline in or on peach and pear (MRL 0.35 mg kg<sup>-1</sup>) (10).

In Brazil, the Ministry of Agriculture has established the use of OTC for cultivation of some food commodities: tomato, potato, beans, cucumber, coffee, peach, plum, passion fruit and pepper. The maximum residue limit (MRL) permitted is 0.25 mg kg<sup>-1</sup> for all commodities, except for plum (MRL 0.7 mg kg<sup>-1</sup>) (11).

The widespread utilization of tetracyclines leads to an increasing resistance factor, so accurate monitoring by public health agencies is required. OTC can be successfully determined in various biological matrices and several reports are

available in the literature about the determination of OTC residues in different matrices of animal origin. On other hand, only a few studies have been carried out in vegetables (12).

Several reports are available about the decline of pesticide residues on food materials and the investigators have found that these active ingredients decrease with time or by various culinary applications, depending on the type and properties of the pesticides (13).

Cengiz et al. (8) investigated the residues quantities of the pesticides captan and procymidone in tomatoes samples comparing the cultivation in two different greenhouses and culinary applications. Greenhouses are framed structures covered with transparent or translucent material and large enough to grow crops under partial or fully controlled environmental conditions to get maximum productivity and quality produce (2). The same authors also studied the residues contents of the pesticides DDVP (dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of the pre-harvest interval and pos-harvest culinary applications (14).

Another study was undertaken by Gambacorta et al. (13) to evaluate the decline of the pesticide residues (benalaxyl, chlorothalonil and methomyl) in a variety of processing tomato grown in open field. The authors Zhang et al. (15) developed a multi-residual method to determine the dynamics of the pesticides (chlorpyrifos, dimethoate, cyhalothrin, cypermethrin, fenvalerate, deltamethrin and chlorothalonil) in the spring cabbage grown in the open field. The results of these studies showed that some pesticides residues were reduced by the pre-harvest intervals and/or culinary applications, such as washing, peeling and storage.

Studies and information comparing the antibiotics residues decline in some vegetables grown in open field and greenhouse at the same time, including the tomatoes, are lacking. Then, a study was undertaken to evaluate the decline of the residues of OTC in tomatoes grown in open field and greenhouse.

In view of the importance of this crop, this study seems necessary and the present work reports the results of an investigation which aims to describe the

residual behaviour of the OTC applied in open field and greenhouse in fresh tomatoes and compares the residual concentrations of OTC obtained in this study with the legal limits permitted in Brazil.

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 2.1. Apparatus

The HPLC system consisted of a Shimadzu LC-10ATvp (Kyoto, Japan) gradient system equipped with a Shimadzu SIL-10AF (Kyoto, Japan) auto injector with a 50  $\mu$ L loop. The column oven used was a Shimadzu CTO-10ASvp (Kyoto, Japan) operated at 20°C and the flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phase was degassed using a ultrasonic bath (Unique, São Paulo, Brazil) for 30 min. The fluorescence detector was a Shimadzu RF-10Axl (Kyoto, Japan) at 390 nm excitation and 512 nm emission. Data acquisition and treatment was performed by a chromatography data system Class-VP (Shimadzu). A BDS Hypersil C<sub>18</sub> 5 $\mu$ m column (150mm x 4.6mm i.d.) and a similar pre-column (4mm x 4.6mm i.d.) from Thermo (Bellefonte, USA) were used for the separation. Vortex mixer used was Certomat MV from B. Braun Biotech International (Melsungen, Germany). Measurements of pH were made with a model NT PH2 pH-meter from Nova Técnica (São Paulo, Brazil), using a combined glass electrode. For solid phase extraction, a Visiprep DL vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, USA) with 12 ports model was employed.

### 2.2. Standards and reagents

Standards of oxytetracycline hydrochloride and tetracycline (TC) hydrochloride were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Analytical reagent grade sodium acetate, calcium chloride, disodium EDTA, citric acid, disodium hydrogen phosphate were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade methanol was purchased from J. T. Baker (Philipsburg, USA) and n-hexane analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Throughout the study, water

was obtained from a Milli-Q system from Millipore (USA). Before analysis, the mobile phase was filtered through a 0.45 µm nylon filter from Millipore (São Paulo, Brazil) under vacuum. The McIlvaine buffer (pH 4.0) and Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 4.0 and 8.0) solutions were weekly prepared as previously described (16).

### 2.3. Experimental design

The greenhouse and open field study were conducted during April - September 2006 at the Experimental Research Farm, located in University of Alfenas, MG, Brazil. In open field study, seeds of tomato cultivar Santa Clara were placed in trays of 128 cels using commercial substrate Plantmax mixed with carbonized rice husk. The seedlings were transplanted to open field in spacing 1,00m x 0,50m in total plot being comprised of 24 plants. The conduction of culture was done in accordance to the good agricultural practice.

The greenhouse cultivation was done in hidroponic conditions by nutrient film technique (NFT) system and was undertaken in a natural ventilated greenhouse at the Experimental research Farm located in University of Alfenas, MG, Brazil. It was semicircular shaped covering a floor area 10 x 18 (180 m<sup>2</sup>) with sidewall ventilation and was covered with an ultra violet stabilized low-density polyethylene film having 150 micra thickness. The orientation of the greenhouse was north-south direction and the air temperature inside of greenhouse was around 25 °C during the experimental period. Cultivation canals spacing of 0.80 m and 17 m of length were used to support of transplanted seedling and the circulation of nutritive solution. The Santa Clara tomato seeds were placed in phenolic foam and the seedling were transferred to cultivation canals in space of 30 cm of plants. The fertigation was done on following form: during the day, the circulation of nutritive solution was done during 15 minutes in intervals of 45 minutes and during the nigh in intervals of 3 hours. The harvest was performed in the same period of the plants grown in open field. Santa Clara tomato seeds were kindly provided by Institute of Agronomy, Agricultural Research Center, University of Alfenas.

#### 2.4. OTC application

The plants (greenhouse and open field) were subjected to treatment with a commercial product which contains in its commercial formulation the active ingredient oxytetracycline at the concentration of 200 g kg<sup>-1</sup>. The dose employed was 2.0 kg ha<sup>-1</sup>. The commercial product was diluted in water and mixed according to the manufacturer (200 g in 100 L). The treatment was performed when the fruits were at the breaker stage of maturation. The prepared suspension was applied uniformly onto the tomato plants by using a backpack-spraying pump. The amount to be delivered per plant was calculated, based on the amount of bactericide that is generally recommended per acre and the number of tomato plants that would be grown in the field and greenhouse area. The application was done at 10:00 a.m., on a sunny and windless day with a temperature of 25°C. A separate plot was used to obtain untreated tomatoes for the method developing and validation for the OTC residues determination.

#### 2.5. Sample collection

Sampling was made after 1, 2, 3, 4, 5 and 6 days from the treatment by picking a 1 kg sample from each of the replicates. Fruits were randomly sampled from the plants and were collected separated from the open field and the greenhouse. Each tomato sample consisted of at least ten individual pieces of fruit (17). All samples were put into plastic bags and transported to the laboratory, where they were immediately subjected to analysis in order to determine the OTC residues. The tomato samples were collected during the 7 days (pre-harvest period as recommended by the OTC manufacturer).

#### 2.6. Cleanup and extraction procedure

The tomatoes of each sample (1 kg) were washed with water, chopped, triturated and homogenized in a blender. Then it was sieved and a portion of 1 g was weighed and placed into a glass tube and dissolved in 10 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer (pH 8.0). The sample solution was shaken for 3 min in a

vortex mixer at high speed. After filtration through a Buchner funnel, the sample was then submitted to liquid-liquid extraction (LLE) with 10 mL of hexane in a separatory funnel. The aqueous phase was adjusted to the pH 4.0 with citric acid  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  and was applied to a  $\text{C}_{18}$  (octadecyl, unendcapped) SPE cartridge, 500mg/3mL. This cartridge was previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine buffer (pH 4.0). Then, the cartridge containing the sample was washed with 3 mL of McIlvaine buffer (pH 4.0) : methanol (85:15, v/v). The OTC and TC were eluted with 3 mL of methanol. The eluate was concentrated to dryness under nitrogen at  $40^\circ\text{C}$  and the residue was dissolved in 0.1 mL of the mobile phase. The final eluate was filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  membrane filters Millipore (São Paulo, Brazil) and stirred in vortex before injecting into the chromatograph. An aliquot of  $50 \mu\text{L}$  was injected.

## 2.7. HPLC procedure

The separation conditions for the oxytetracycline and tetracycline were a mobile phase flow  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$  containing a aqueous solution  $0.035 \text{ mol L}^{-1}$  calcium chloride,  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and  $0.075 \text{ mol L}^{-1}$  sodium acetate buffered to pH 7.3 and methanol (70:30, v/v) filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  nylon filter under vacuum and degassed by ultrasonication. Oven temperature was  $20^\circ\text{C}$  and operated at an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 512 nm. The autosampler was set to inject  $50 \mu\text{L}$  aliquots of samples. The quantitation was accomplished through an internal analytical curve with six concentration levels in the range of  $100\text{-}350 \mu\text{g kg}^{-1}$  (OTC) and  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  (TC) as internal standard.

## 2.8. Statistical evaluation

All residue analysis were replicated in two different cultivation systems: open field (conventional cultivation) and greenhouse (protected cultivation). Each replicate sample was analysed for OTC residue in triplicate analysis. All analysis were performed on six days and the results were statistically analysed by ANOVA ( $P>0.05$ ). Significant means were subjected to analysis by Tukey test. All statistical analysis were performed using the R Program (Free software, England).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Method validation

The HPLC method was *in-house* validated for the analyses of the OTC by evaluation of the following parameters: linear range, correlation coefficient, sensitivity, detection and quantitation limits, intra- and inter-day precision. The results are summarized in Table 1.

The correlation coefficient, linear range and sensitivity were obtained from analytical curves using an internal standard (TC) at six concentration levels for the OTC, with quintuplicate analyses. The precision of the method for OTC was evaluated using the results obtained over one day of operation under the same conditions (intra-day) and for 5 days (inter-day). The results are expressed as relative standard deviations (RSD) in Table 1.

### 3.2. Results of the OTC application

The analytical determinations were made in triplicate for each sampling (open field and greenhouse) and the results of OTC residue analysis are presented in Table 2.

According to results of variance analysis, no statistical differences were observed between two different cultivation systems open field (conventional cultivation) and greenhouse (protected cultivation) on the reduction of residue levels ( $P>0.05$ ). Thus, the effects of these different cultivation systems were

similar, however significant reductions in residue levels for OTC were obtained through both open field and greenhouse ( $P < 0.05$ ) when the comparison was done considering the time of cultivation.

The Figure 1 shows percentages of detected average of OTC residues after collection of tomato fruit after different days of application. The first analysis was done in tomatoes samples after a day of treatment. As expected, the values at time 1 were above of the MRL established by the regulatory agencies ( $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

**Table 1.** Quantitative features for OTC.

Parameter	OTC
Linear range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	100 - 350
Sensitivity (Volts $\mu\text{g}^{-1} \text{kg}$ ) ( $P < 0.05$ )	0.0034
Correlation coefficient ( $r$ )	0.9991
Intercept ( $P < 0.05$ )	-0.0319
Intra-day precision, $n=5$ , (RSD %)*	
fortified at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$	5.9
$250 \mu\text{g kg}^{-1}$	5.2
$350 \mu\text{g kg}^{-1}$	6.5
Inter-day precision, $n=5$ , (RSD %)*	
fortified at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$	8.6
$250 \mu\text{g kg}^{-1}$	10.8
$350 \mu\text{g kg}^{-1}$	11.9
LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	10
LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	30

RSD: relative standard deviation.

$n$  = number of replicates.

LOD: limit of detection and LOQ: limit of quantitation.



**Table 2.** Levels of OTC in tomatos produced by two different cultivation systems, expressed as  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Cultivation system	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Open field	502 $\pm$ 34	349 $\pm$ 31	231 $\pm$ 14	51 $\pm$ 2	nd
Greenhouse	459 $\pm$ 17	425 $\pm$ 13	247 $\pm$ 16	70 $\pm$ 4	nd

Values are given as means  $\pm$  standard error.  
 nd = not detectable ( $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

The OTC residue level in Day 1 was decreased 30.5 % (open field) and 7.4 % (greenhouse) and 54.0 % and 46.2 %, respectively, in Day 2. If we consider the residues after the pre-harvest interval established by the Brazilian Legislation ( $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) the value of OTC obtained did not seem very high. The OTC concentration in the Day 3 (open field,  $231 \mu\text{g kg}^{-1}$  and greenhouse,  $247 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) did not exceed the MRL. In this study, the results shown at Day 4 the residual OTC concentration corresponded to about 20.4 % and 28.0 % of the MRL. At Day 5 and Day 6 the residues were not detect by the method in the tomato samples.

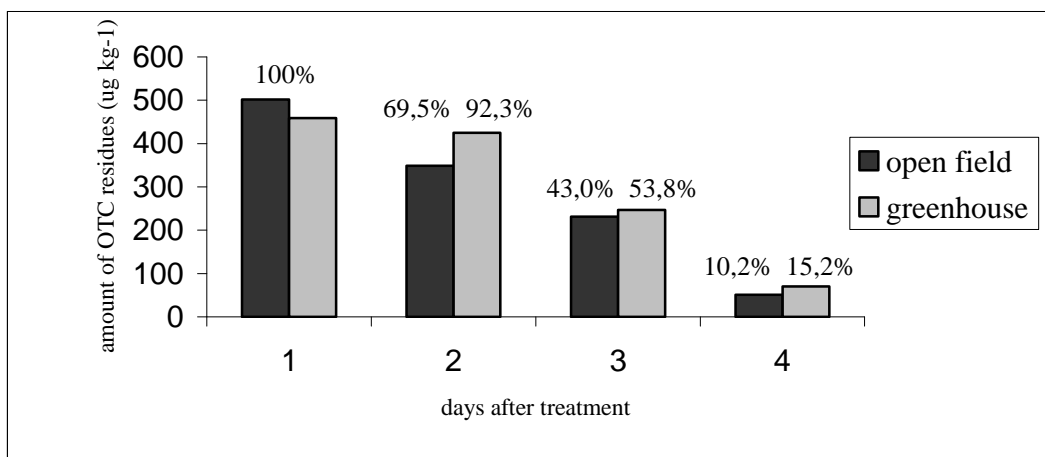


Figure 1- Percentages of detected average of OTC residues in tomatoes grown in open field and greenhouse after chemical treatment in different days of application. Day 5 and Day 6 not detectable ( $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

We could not compare the residual values found in our experimentation with another ones because there is not information about the behavior of OTC after its use in tomato crop cultivation. In our study was demonstrated similar behavior when compare open field and greenhouse growing. This fact may be due to the weather conditions during the experiments. These conditions are sunny days and no rain during the experimentation. In rain condition, the residues may be subject to lixiviation. During this study, the OTC residues were not lost by lixiviation.

As expect, when plotting the residual concentration of OTC in tomatoes against the time for each data set (Table 2) were found a rapid decrease of the active ingredient. This fact is though because the OTC is known to have the mode of action locally systemic, it means that they penetrate the plant's tissues, but move only to a limited extent within the plant (18) and it is presumed that only few OTC penetrated into the plant tissue and could be removed effectively by washing. In our experimentation, it could be the reason for which the residues decreased so fast and do not depend on different cultivation systems.

On the other hand, when compare the persistence of OTC obtained through both open field and greenhouse (Figure 1), a statistical difference ( $P < 0.05$ ) was observed and seem that the greenhouse cultivation concentrated more residue levels than open field although at the same way of the fruits grown by open field cultivation, in the Day 3 the MRL was not exceeded.

#### **4. CONCLUSIONS**

The recommended pre-harvest interval (7 days) following application of the OTC bactericide had an obviously decreasing effect on OTC residues in tomatoes grown in open field and greenhouse. The OTC levels were found to be below the MRL ( $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) at Day 3 of treatment and no detected levels of OTC were observed after the Day 4. The OTC levels were reduced to acceptable concentrations when is obeyed the recommended pre-harvest interval by the agricultural producers.

In addition, the results show that no differences were observed when we compare the residue reduction in tomatoes grown in open field and greenhouse. It can be concluded that controlled dose setting for the use of OTC bactericide, controlled open field and greenhouse treatments and the obey to the pre-harvest interval have a crucial role in the reduction of residual bactericides reducing the risk in the consumption of tomatoes sold as a fresh product.

Unfortunately, as far as we know there is not information about the behaviour of OTC in tomatoes grown in open field and greenhouse, therefore a deeper investigation is necessary and further studies should also be performed to better assess the behaviour of this bactericide/fungicide after scheduled treatments and considering different varieties of tomatoes, which are commonly used as a fresh food.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support from CAPES and CNPq, and Professor L. A. Beijo for statistical analysis.

### **REFERENCES**

- (1) FAO Food and Agriculture Organization of United Nations, Agriculture Data, 2005  
(Available at: <http://faostat.fao.org>) (Accessed on 08 May 2007).
- (2) Mahajan, G.; Singh, K.G. Response of greenhouse tomato to irrigation and fertigation. *Agric. Water Manage.* **2006**, 84, 202-206.
- (3) FAO Food and Agriculture Organization of United Nations, Crop Water Management  
(Available at: <http://www.fao.org/ag/agl/aglw/cropwater/tomato.stm>) (Accessed on 08 May 2007).

- (4) Pernezny, K.; Ködela, V.; Kokosková, B.; Hládká, I. Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among cooper-tolerant bacterial strains. *Crop. Protec.* **1995**, 14, 267-270.
- (5) Umesha, S. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protec.* **2006**, 25, 375-381.
- (6) Lopes, C.A.; Quezado, A.M., Doenças bacterianas das hortaliças. Diagnose e controle. Embrapa, Brasília, Brazil, 1997, pp.15-17.
- (7) Hernández, M.; Borrul, F.; Callul, M. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 416-427.
- (8) Cengiz, M.F.; Certel, M.; Karakaş, B; Göçmen, H. Residue contents of captan and procymidone applied on tomatoes grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chem.* **2007**, 100, 1611-1619.
- (9) WHO, 1998, Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.  
(Available at: [http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec\\_1817.htm](http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_1817.htm))  
(Accessed on 08 May 2007).
- (10) EPA, 2005, U.S. Environmental Protection Agency  
(Available at: [http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_05/40cfr180\\_05.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_05/40cfr180_05.html))  
(Accessed on 08 May 2007).
- (11) Brazil, MS/ANVISA Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria No. 10, 08 March 1985.  
(Available at: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=284&word>)  
(Accessed on 08 May 2007).
- (12) Oka, H.; Ito, Y., Matsumoto, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A* **2000**, 882, 109-133.
- (13) Gambacorta, G.; Faccia, M.; Lamacchia, A.; Di Luccia, A.; La Notte, E. Pesticides residues in tomato grown in open field. *Food Control* **2005**, 16, 629-632.

- (14) Cengiz, M. F.; Certel, M.; Göçmen, H. Residue contents of DDVP (dichlorvos) and diazinon applied on cucumbers grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chemistry* **2006**, 98, 127-135.
- (15) Zhang, Z-Y.; Liu, X-J.; Yu, X-Y.; Zhang, C-Z.; Hong, X-Y. Pesticide residues in the spring cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) grown in open field. *Food Control*. **2006**, doi:10.1016/j.foodcont.2006.04.001
- (16) Pena, A. L. S.; Lino, C. M.; Silveira, M. I. N. Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using postcolumn derivatization with fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **1999**, 82, 55-60.
- (17) Commission Directive 2002/63/EC of 21 July establishing Community methods of sampling for the official control of pesticides residues in and on products of plant and animal origin.  
(Available at:  
[http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l\\_187/l\\_18720020716en00300043.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l_187/l_18720020716en00300043.pdf))  
(Accessed on 08 May 2007).
- (18) Compêndio de Defensivos Agrícolas (1990), 3<sup>rd</sup> ed. Organização Andrei Editora Ltda, (pp. 478).

## CONCLUSÕES GERAIS

O método de análise por eletroforese capilar proposto para a determinação de oxitetraciclina e estreptomicina em bactericidas de uso agrícola, mostrou-se adequado para a quantificação dos princípios ativos nesses produtos. O método proposto apresenta vantagens por ser simples, dispensar o uso de solventes orgânicos e mostrar baixo custo dos reagentes, além de separar os dois antimicrobianos numa mesma corrida.

A metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de oxitetraciclina em tomates, apresentou-se eficiente, considerando os parâmetros de validação (limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão), onde os valores encontrados nos limites de quantificação ficaram abaixo do LMR exigido pela legislação brasileira em vigor podendo, dessa forma, ser utilizada como método para detecção de resíduos de oxitetraciclina nessa matriz.

Os resultados obtidos no estudo que comparou a persistência da oxitetraciclina em tomates nos distintos cultivos campo e estufa, mostraram que não houve diferença significativa quando se compara os distintos cultivos, embora tenha sido observado que o cultivo em estufa concentra maiores quantidades de oxitetraciclina. Apesar desse fato, o intervalo de pré-colheita recomendado pelo fabricante (7 dias) reduz a concentração dos resíduos em ambos os plantios a níveis aceitáveis pela legislação brasileira em vigor.

# **ANEXOS**





## ANEXO I

### **Validação de método para a determinação de oxitetraciclina e estreptomicina em bactericidas agrícolas por eletroforese capilar de zona**

Introdução: antimicrobianos de uso veterinário como a oxitetraciclina (OTC) e a estreptomicina (STP) são também utilizados como bactericidas em produtos de origem vegetal visando o combate de doenças bacterianas em várias culturas e a preservação de frutas, grãos e vegetais. A eletroforese capilar de zona tem sido usada para separar antibióticos por ser uma técnica que possui alto poder de resolução, curto tempo de análise e baixo custo operacional quando comparado com a cromatografia líquida. Objetivo: desenvolver um método para determinar simultaneamente OTC e STP em formulações agrícolas comercializadas no Brasil. Metodologia: foram testados e otimizados vários parâmetros como composição do tampão, concentração e pH do tampão, uso de surfactante e EDTA, temperatura, voltagem, bem como tamanho e tipo de capilar, pressão e tempo de injeção. Resultados: as melhores condições para a separação dos dois antimicrobianos foram obtidas com o uso de um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e comprimento total de 31,0 cm (efetivo de 22,5 cm). A temperatura empregada foi de 20°C e voltagem de 7,0 kV, nas condições de pressão de injeção de 20 mbar x 30 seg. O tampão utilizado foi o fosfato monobásico de sódio na concentração de 100 mM a pH 2,5. Os analitos foram monitorados por um detector de arranjo de diodos e a quantificação foi realizada em 195 nm em polaridade positiva. Os limites de detecção foram de 2 µg/mL para OTC e 3 µg/mL para a STP. A precisão foi avaliada pela estimativa do desvio padrão que variou de 0,13 a 0,36 % (STP) e 0,81 a 4,86 % (OTC) no estudo intra-dia e 2,80 a 3,12 % (STP) e 4,97 a 5,20 % (OTC) no estudo inter-dias. A curva analítica foi construída com 5 níveis em triplicata e foi linear numa faixa de 20 a 100 µg/mL com linearidade de 0,9993 (STP) e 0,9978 (OTC). O tempo de migração dos analitos ficou em torno de 6 e 12 minutos para a STP e OTC, respectivamente. Dentre os

parâmetros de validação foram também avaliados a seletividade, estabilidade e exatidão do método. Paralelamente aos estudos foram feitos testes para checar a conformidade do sistema, verificando a largura, número de pratos, simetria, resolução e espectro dos picos. A robustez foi estudada através de planejamento fatorial visando testar a influência de pequenas variações no pH, temperatura e voltagem. Conclusões: a metodologia se mostrou apropriada para a detecção em uma única corrida de OTC e STP em preparações farmacêuticas por oferecer sensibilidade e seletividade, além de não ser necessário o uso de reações de derivatização para a STP, o que implicaria em maior custo e tempo de análise.

Resumo apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia

Recife, PE, 09 a 12 de Outubro de 2005

Publicado na Revista Brasileira de Toxicologia, v.18, n.1, 2005, p.171.

## ANEXO II

### **Validação de método para a determinação de oxitetraciclina em tomates por cromatografia líquida de alta eficiência**

**INTRODUÇÃO:** A Oxitetraciclina (OTC) é um fungicida e bactericida utilizado no tratamento de tubérculos e sementes e na aplicação das partes aéreas de diversos frutos e hortaliças não folhosas. Em tomates, um vegetal muito sensível a bacterioses, a OTC é usada para prevenção e tratamento de enfermidades como a mancha e cancro bacteriano. Esse uso pode incorrer na presença de resíduos no alimento expondo os consumidores a essa substância. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação versátil muito utilizada na análise de alimentos e tem sido o principal método de detecção e quantificação empregado na determinação de tetraciclinas. O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico para a determinação desse antimicrobiano em tomates por CLAE com detecção por fluorescência.

**METODOLOGIA:** O preparo da amostra foi feito a partir de extração líquido-líquido (ELL), onde foram avaliados diferentes solventes extratores, seguido de extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos com fase octadecil tipo C18. Nessa etapa foram testadas diferentes marcas de cartuchos, bem como solventes e tampões nas etapas de condicionamento, passagem da amostra, lavagem e eluição, visando obter os melhores resultados de recuperação da oxitetraciclina da matriz. Utilizou-se cromatógrafo a líquido Shimadzu VP, equipado com detector de fluorescência RF-10Avp, programa de dados e integração Class VP e coluna cromatográfica *end-capped* tipo C18 BDS Hypersil com 150 x 4,6 mm (comprimento x diâmetro interno) e 5 µm de tamanho de partícula. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram: temperatura do forno e composição, concentração e pH da fase móvel visando obter a melhor resolução dos analitos, assim como os comprimentos de onda de excitação e de emissão do detector. Tetraciclina (TC) foi utilizada como padrão interno.

**RESULTADOS:** O melhor solvente de extração na ELL foi hexano. Para purificação do extrato no cartucho SPE foi utilizada, para lavagem, solução tampão McIlvaine (pH 4,0) + metanol (85:15 v/v) e metanol para eluição. A melhor condição para a detecção por fluorescência foi nos comprimentos de onda  $\lambda = 390$  nm (excitação) e 512 nm (emissão), e de resolução foram: temperatura do forno 20° C, fase móvel composta de solução tampão (acetato de sódio (0,075 M), cloreto de cálcio (0,035 M) e EDTA sal dissódico (0,025 M) ajustado para pH = 7,3) e metanol (7:3 v/v), com vazão de 0,8 mL/min. Os limites de detecção e quantificação para a OTC foram de 10 µg/kg e 30 µg/kg, respectivamente. A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação que variou de 1,4 a 2,6 % no estudo intra-dia e 4,5 a 5,2 % no estudo inter-dias. A curva analítica foi construída com 6 níveis de fortificação em quintuplicata e foi linear na faixa de 100 a 350 µg/kg com linearidade de 0,9991. O tempo de retenção dos analitos ficou em torno de 7 e 11 minutos para a OTC e TC, respectivamente. Foram também avaliados a seletividade, estabilidade e exatidão do método. Testes foram realizados para avaliar a conformidade do sistema cromatográfico, verificando a largura, número de pratos, simetria, resolução e espectro dos picos.

**CONCLUSÕES:** O uso da ELL juntamente com a SPE permitiu a obtenção de uma boa recuperação do analito. A detecção por fluorescência apresentou sensibilidade que permitiu detectar níveis abaixo do limite máximo de resíduo (LMR) permitido para OTC em tomates que é de 250 µg/kg, bem como limites de quantificação e precisão satisfatórios. A metodologia se mostrou apropriada para a determinação de OTC em tomates.

Instituição de fomento: CAPES

Resumo apresentado 58a. Reunião Anual da SBPC

Florianópolis, SC, 16 a 21 de Julho de 2006

Publicado no livro eletrônico de Resumos

## ANEXO III

### **Determination of oxytetracycline in tomatoes by HPLC using fluorescence detection**

An analytical method for the determination of oxytetracycline (OTC) in tomatoes was developed and validated. Liquid-liquid extraction (LLE) and a solid-phase extraction (SPE) were used for sample preparation. Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a C<sub>18</sub> column and a mobile phase containing MeOH : calcium chloride, disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and sodium acetate, pH 7.3 (30:70, v/v), with fluorescence detection at 390 nm excitation and 512 nm emission, was used for separation and quantitation of OTC. The method was validated through the following performance criteria: linearity and linear range, sensitivity, selectivity, intra-day and inter-day precision, detection and quantitation limits and accuracy. Limit of quantitation show that the method developed is suitable for the determination of OTC at a level below the maximum residue limits established by the Brazilian legislation (250 µg kg<sup>-1</sup>). The analytical method was applied to 40 tomato samples and none contained OTC above the limit of quantitation.

Resumo apresentado no XI International Congress of Toxicology.

Montréal, Canadá, 15 a 19 de Julho de 2007

Publicado no livro eletrônico de Resumos