

**Isabela Maia Toaldo**

**Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para  
determinação de resíduos de antimicrobianos em leite  
por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS**

**Florianópolis – Santa Catarina  
2011**



**Isabela Maia Toaldo**

**Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para  
determinação de resíduos de antimicrobianos em leite  
por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Marilde Bordignon Luiz**

**Florianópolis – Santa Catarina  
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

T627d Toaldo, Isabela Maia  
Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para  
determinação de resíduos de antimicrobianos em leite por CLAE-  
FL/DAD e CLAE-MS/MS [dissertação] / Isabela Maia Toaldo ;  
orientadora, Marilde Terezinha Bordignon Luiz. –  
Florianópolis, SC, 2011.  
146 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Leite. 3. Agentes  
antiinfeciosos. 4. Resíduos. I. Luiz, Marilde Terezinha  
Bordignon. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.  
Título.

CDU 663

**Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para  
determinação de resíduos de antimicrobianos em leite  
por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS**

Por

**Isabela Maia Toaldo**

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela comissão formada por:

Presidente: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilde T. Bordignon-Luiz (UFSC)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elza Iouko Ida (UEL)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Maisonnave Arisi (UFSC)

Membro: \_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup> Léa Luzia Freitas Costa (LACEN)

Coordenadora: \_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roseane Fett (UFSC)

Florianópolis, 16 de setembro de 2011.



## **Agradecimentos**

Primeiramente à minha família, meus pais Júlio César e Natália Maria, e meu irmão Augusto, pelo amor e apoio incondicionais. Meu eterno amor e gratidão!

Ao meu namorado Jefferson, pelo carinho e constante companheirismo, pela compreensão e motivação nos momentos difíceis, e principalmente, por compartilhar seu conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC, pela oportunidade de crescimento intelectual e vivência acadêmica permitida aos alunos.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilde Bordignon, por sempre ter acreditado em mim, pela confiança, incentivo e compreensão, e especialmente, pelos valiosos ensinamentos na constante orientação do trabalho.

Aos colegas de projeto, Lídia Picinin, Luciana Tallini e Gabriel Zandonadi, pelas imprescindíveis contribuições nas atividades, e acima de tudo, pela dedicação e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFSC, pelo companheirismo e amizade, e por todas as contribuições no desenvolvimento e realização da pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do LANAGRO/RS, pela ajuda técnica e científica para realização do trabalho, e em especial pela amizade conquistada.

Aos mais queridos amigos, Fabrício, Bruna, Pollyanna e Ellen, pelos conselhos em todos os momentos, pela compreensão, carinho e inestimável amizade.

Aos membros da banca examinadora pelo gentil aceite do convite de participação e suas contribuições pertinentes ao trabalho.

Ao CNPq, CAPES e MAPA, pelo auxílio financeiro para realização da pesquisa.



## Resumo

**TOALDO, Isabela Maia. Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS.** 2011. 146p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Antimicrobianos são extensivamente empregados na medicina veterinária para prevenção e tratamento de infecções em animais produtores de alimentos. O uso disseminado desses fármacos na prática leiteira acarreta a presença de seus resíduos no leite. Resíduos de antimicrobianos representam riscos à saúde do consumidor, podendo causar reações de hipersensibilidade e resistência microbiana. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar método multirresíduo para análise de resíduos de sulfonamidas, fluorquinolonas e ceftiofur em leite, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, arranjo de diodos e espectrometria de massas. Diferentes etapas foram avaliadas quanto à extração dos antimicrobianos em leite, sendo empregadas extrações líquido-líquido e em fase sólida. O método quantitativo foi avaliado quanto aos critérios de desempenho: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e robustez, para validação analítica segundo a Diretiva 657/2002 da Comunidade Européia. Adicionalmente, a identidade dos compostos foi confirmada por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas, a partir de extração líquido-líquido em leite. De modo a avaliar o desempenho dos métodos, diferentes amostras de leite obtidas comercialmente foram analisadas pelos métodos quantitativo e confirmatório. A extração líquido-líquido com água 10% ácido tricloroacético demonstrou melhor resultado para extração dos resíduos em leite, em comparação à extração em fase sólida. O gradiente de eluição permitiu a separação cromatográfica de onze antimicrobianos, compreendo quatro fluorquinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino, danofloxacino e enrofloxacino), seis sulfonamidas (sulfatiazol, sulfaclopiridazina, sulfametoxazol, sulfamerazina, sulfadoxina e sulfadimetoxina) e uma cefalosporina (ceftiofur). O método foi validado em conformidade com a Legislação Européia com desempenho analítico adequado. Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) foram superiores a 0,98 para todas as curvas, com recuperações superiores a 98% para todos os

analitos e limites de detecção e quantificação abaixo dos valores de limite máximo permitido para os compostos em leite. A repetibilidade e a reprodutibilidade foram inferiores ou iguais a 7,40% e 10,13%, respectivamente. Nas amostras de leite não houve detecção para os antimicrobianos. Os métodos desenvolvidos representam alternativa eficiente para análise multirresíduo em leite, com aplicabilidade confirmada pela análise de amostras reais de leite de diferentes origens.

**Palavras-chave:** Leite, antimicrobianos, multirresíduo, validação, CLAE-FL/DAD, CLAE-MS/MS.

## Abstract

**TOALDO, Isabela Maia. Development and validation of multiresidue method for determination of antimicrobial residues in milk using LC-FD/DAD and LC-MS/MS.** 2011. 146p. Dissertation (Master's in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Antimicrobials are extensively used in veterinary medicine for prevention and treatment of infections in food-producing animals. The widespread use of these drugs in dairy practice leads to the presence of its residues in milk. Antimicrobial residues can pose risks to consumers health, may causing hypersensitivity reactions and microbial resistance. The objective of this work was to develop and validate multiresidue method for the analysis of sulfonamide, fluoroquinolone, and ceftiofur residues in milk, using high performance liquid chromatography with fluorescence, diode array and mass spectrometry detections. Different steps were evaluated for extracting antimicrobials in milk, by applying liquid-liquid and solid phase extractions. The quantitative method was evaluated regarding performance criteria: selectivity, linearity and working range, sensitivity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit, decision limit ( $CC\alpha$ ), detection capability ( $CC\beta$ ) and robustness, for analytical validation according to Directive 657/2002 of the European Community. Additionally, the analytes identities were confirmed by liquid chromatography with mass spectrometry detection, through a liquid-liquid extraction in milk. To evaluate methods performance, different milk samples obtained at local markets were analyzed by both quantitative and confirmatory methods. The liquid-liquid extraction with 10% trichloroacetic acid in water showed better results for residue extraction in milk compared to solid phase extraction. The elution gradient allowed the chromatographic separation of eleven antimicrobials, comprising four fluoroquinolones (ciprofloxacin, norfloxacin, danofloxacin and enrofloxacin), six sulfonamides (sulfathiazole, sulfachlorpyridazine, sulfamethoxazole, sulfamerazine, sulfadoxine and sulfadimethoxine) and one cephalosporin (ceftiofur). The quantitative method was validated in line with European requirements with adequate analytical performance. The correlation coefficients ( $r^2$ ) were greater than 0.98 for all curves, also the recoveries rates were above 98% for all analytes and the LOD and LOQ limits were lower than the maximum permitted limit for the compounds in milk. The intra-day and inter-day precisions were below or equal to

7.40% and 10.13%, respectively. Milk samples showed no detection for the antimicrobials. The developed methods comprise an efficient alternative to multiresidue analysis in milk, with applicability confirmed by analysis of real milk samples from different origins.

**Keywords:** Milk, antimicrobials, multiresidue, validation, LC-FD/DAD, LC-MS/MS.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AF	– Ácido fórmico
TCA	– Ácido tricloroacético
C <sub>18</sub>	– Coluna de fase estacionária octadecil
CC <sub>α</sub>	– Limite de Decisão
CC <sub>β</sub>	– Capacidade de Detecção
CEF	– Ceftiofur
CIP	– Ciprofloxacino
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CLC-ODS	– Coluna para cromatografia líquida de fase estacionária octadecil
CV	– Coeficiente de variação
DAD	– Detector de arranjo de diodos
DAN	– Danofloxacino
DPR	– Desvio padrão relativo
EC	– Comissão Européia
En	– Energia de colisão
ELISA	– Ensaio Imunoenzimático
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENR	– Enrofloxacino
ESI-MS/MS	– Espectrometria de massas em tandem com fonte de ionização por eletrospray
FAO	– Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FL	– Detector de fluorescência
FLISA	– Ensaio de imunofluorescência
G-ODS	– Pré-coluna com fase estacionária octadecil
IDA	– Ingestão Diária Aceitável
JECFA	– <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
LD	– Limite de detecção
LMR	– Limite Máximo de Resíduo
LOM	– Lomefloxacino
LQ	– Limite de quantificação
m/z	– Relação massa/carga do íon de transição
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	– Acetonitrila

MeOH	– Metanol
MM	– Massa molar
MRM	– Monitoramento de múltiplas reações
MS	– Detector por espectrometria de massas
MS/MS	– Detector por espectrometria de massas em modo <i>tandem</i>
NOR	– Norfloxacino
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PAMVet	– Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PCRCL	– Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite
PI	– Padrão interno
PNCRC	– Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
ppb	– Parte por bilhão
ppt	– Parte por trilhão
PTFE	– Politetrafluoretileno
$r^2$	– Coeficiente de correlação de equação da reta
DPR	– Desvio padrão relativo
SACE	– Extração em fase sólida com adsorvente trocador de cátions
SBAE	– Extração em fase sólida com adsorvente trocador de ânions
SIF	– Serviço de Inspeção Federal
SCP	– Sulfaclorpiridazina
SDMX	– Sulfadimetoxina
SDX	– Sulfadoxina
SMA	– Sulfametoxazol
SMR	– Sulfamerazina
SPE	– Extração em fase sólida
SPY	– Sulfapiridina
STZ	– Sulfatiazol
$T_M$	– Tempo morto de corrida cromatográfica
$T_R$	– Tempo de retenção cromatográfico
UHT	– <i>Ultra High Temperature</i>
UPLC	– Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV	– Detector de ultravioleta
W	– Largura de pico cromatográfico
WHO	– <i>World Health Organization</i>
$[M+H]^+$	– Íon precursor molecular positivo

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

- Figura 1.1.** Estrutura geral dos antimicrobianos da classe das sulfonamidas. 25
- Figura 1.2.** Antimicrobianos da classe das sulfonamidas. 26
- Figura 1.3.** Estrutura química do ceftiofur. 27
- Figura 1.4.** Estruturas químicas do (A) ácido nalidíxico, com núcleo naftiridina, e (B) norfloxacino, com núcleo quinolina. 29
- Figura 1.5.** Antimicrobianos da classe das fluorquinolonas. 30

### Capítulo 2

- Figura 2.1.** Cromatogramas do branco da matriz ( $n=20$ ). Análise de leite pasteurizado (A) por fluorescência (FL) e (B) arranjo de diodos (DAD). 72
- Figura 2.2.** Cromatogramas de extração em fase sólida em análises por CLAE-FL ( $n=10$ ). Fluorquinolonas e sulfonamidas em leite ( $1.000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) extraídos com acetonitrila 10% TCA. Adsorventes trocadores de íons SACE (a) e SBAE (b) com condicionamento polar (MeOH + água ultra pura) e eluição com MeOH: MeCN (1:1, v/v); (c) e (d) adsorventes octadecil  $C_{18}$ , eluição com MeOH: MeCN (1:1, v/v), com condicionamento polar (MeOH + água ultra pura) (c) e apolar (acetato de etila + acetona + ácido acético 10:10:1, v/v) (d). 77
- Figura 2.3.** Cromatogramas da extração com água ultra pura 10% TCA de antimicrobianos em leite ( $n=20$ ). (A) Fluorquinolonas e sulfonamidas por CLAE-FL,  $\lambda_{em}/\lambda_{exc} = 280/440 \text{ nm}$  e  $405/495 \text{ nm}$ , respectivamente. (B) Ceftiofur por CLAE-DAD,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . 80
- Figura 2.4.** Cromatogramas das transições  $m/z$  de íons qualificadores das fluorquinolonas e sulfonamidas em leite por CLAE-MS/MS. 83

### Capítulo 3

- Figura 3.1.** Cromatogramas ( $n=10$ ): (a) e (b) fluorquinolonas e sulfonamidas em leite por CLAE-FL; (c) e (d) ceftiofur em leite por CLAE-DAD; (a) e (c) matriz não ortificada; (b) e (d) matriz fortificada com analitos. Níveis de fortificação: NOR, CIP, ENR, CEF, STZ, SMR, SCP, SDX, SMA, SDMX ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ); DAN ( $30 \text{ ng mL}^{-1}$ ); LOM e SPY ( $300 \text{ ng mL}^{-1}$  – padrões interno). NOR=norfloxacinó, CIP=ciprofloxacino, LOM=lomefloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, SPY=sulfapiridina, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclopiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol, SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur. 99
- Figura 3.2.** Cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações. Transições  $m/z$  dos compostos sulfonamidas e fluorquinolonas em leite. 116
- Figura 3.3.** Cromatogramas dos íons qualificadores e confirmatórios das fluorquinolonas, respectivamente. Amostra de leite pasteurizado fortificada com os compostos na concentração de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ . 117
- Figura 3.4.** Cromatogramas dos íons qualificadores e confirmatórios das sulfonamidas, respectivamente. Amostra de leite pasteurizado fortificada com os compostos na concentração de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ . 118
- Figura 3.5.** Cromatogramas dos íons qualificadores das fluorquinolonas e sulfonamidas em amostra de leite UHT semidesnatado não fortificada. 119
- Figura 3.6.** Cromatogramas da análise de leite tipo UHT integral. (A) detector de fluorescência e (B) detector de arranjo de diodos. 123
- Figura 3.7.** Cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações para análise de fluorquinolonas e sulfonamidas em amostra de leite UHT integral analisada por CLAE-MS/MS. 124
- Figura 3.8.** Cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações para análise de fluorquinolonas e sulfonamidas em amostra de leite em pó integral analisada por CLAE-MS/MS. 125

## Lista de Tabelas

### Capítulo 2

- Tabela 2.1.** Condicionamento e eluição empregados nos diferentes adsorventes para extração em fase sólida de resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas em leite pasteurizado. 62
- Tabela 2.2.** Parâmetros otimizados do monitoramento de múltiplas reações para detecção de fluorquinolonas e sulfonamidas por ESI-MS/MS, com a infusão dos compostos na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila. 68
- Tabela 2.3.** Gradiente de eluição otimizado para separação multirresíduo de sulfonamidas, fluorquinolonas e ceftiofur extraídos do leite, nas análises por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS. 75

### Capítulo 3

- Tabela 3.1.** Parâmetros da separação multiclasse de antimicrobianos extraídos em leite em análises por CLAE-FL/DAD. 101
- Tabela 3.2.** Análise de regressão das curvas analíticas.  $y = \text{inclinação} \times C + \text{intercepto}$  ( $y = \text{área analito}/\text{área do padrão interno}$ ;  $C = \text{concentração do analito}$ ). 103
- Tabela 3.3.** Valores mínimos e máximos do desvio padrão relativo dos ensaios de precisão para os compostos analisados nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR em leite. 105
- Tabela 3.4.** Recuperação dos antimicrobianos em amostras fortificadas nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 vezes o LMR para os compostos em leite. 106
- Tabela 3.5.** Parâmetros analíticos. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ). 109
- Tabela 3.6.** Recuperações dos compostos no estudo de robustez. 111
- Tabela 3.7.** Recuperação dos antimicrobianos no estudo do efeito de matriz. 112
- Tabela 3.8.** Análise confirmatória dos antimicrobianos em leite por CLAE-ESI/MS/MS, a partir da extração com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF. 115

**Tabela 3.9.** Limite de detecção e  $CC\beta$  do método confirmatório por CLAE-MS/MS. 121

**Tabela 3.10.** Aplicação dos métodos quantitativo e confirmatório na análise de resíduos de sulfonamidas, fluorquinolonas e ceftiofur em amostras de leite dos municípios de Florianópolis e Porto Alegre. 122

## Sumário

<b>Introdução</b>	21
<b>Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica</b>	23
1 Antimicrobianos	25
1.1 Classe das sulfonamidas	25
1.2 Classe das cefalosporinas	27
1.3 Classe das quinolonas	28
2 Antimicrobianos na atividade leiteira	30
3 Resíduos de antimicrobianos em leite	33
4 Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em leite	34
5 Ensaio qualitativo e métodos de triagem de resíduos antimicrobianos em leite	39
6 Métodos confirmatórios para análise de antimicrobianos em alimentos	41
6.1 Análise de cefalosporinas, sulfonamidas e quinolonas	42
7 Análise de ceftiofur, sulfonamidas e quinolonas em matrizes ambientais e biológicas	47
8 Validação analítica	47
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Desenvolvimento de método analítico para determinação de ceftiofur, fluorquinolonas e sulfonamidas em leite</b>	53
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Validação de método multiclasse para análise de resíduos de antimicrobianos em leite</b>	85
<b>Considerações Finais</b>	127
<b>Referências Bibliográficas</b>	129



---

## Introdução

Agentes antimicrobianos são definidos como componentes naturais, semissintéticos e sintéticos, que apresentam atividade farmacológica antimicrobiana, com administração por via parenteral, oral e tópica, sendo os componentes naturais denominados antibióticos (KEMPER, 2008).

Os medicamentos antimicrobianos constituem mais de 6% das prescrições na medicina humana, e mais de 70% do total de fármacos prescritos na prática veterinária. Esses agentes são extensivamente empregados no tratamento de infecções em gado leiteiro, gerando resíduos que são inseridos na cadeia alimentar através do leite, representando risco à saúde do consumidor (BRABANDER et al., 2009; SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001).

O leite é um alimento primordial, consumido em todas as faixas etárias e durante toda a vida do indivíduo, sendo indispensável sua qualidade e inocuidade. No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda a ingestão de até 146 litros de leite por ano para crianças com até 10 anos de idade, e cerca de 219 litros de leite por ano para idosos com mais de setenta anos (EMBRAPA, 2008).

A presença de antimicrobianos em leite compromete a qualidade do alimento e acarreta problemas como a contaminação ambiental proveniente de seus compostos ou de seus derivados metabólicos, além do risco indireto para a saúde humana via micro-organismos patogênicos resistentes a essas substâncias (KEMPER, 2008).

Resíduos de antimicrobianos causam efeitos diretos no organismo humano, como desequilíbrio da microbiota intestinal, e ocorrência de reações adversas e de hipersensibilidade. A influência em longo prazo desses compostos no meio ambiente e seus ecossistemas é de extrema preocupação (GALERA et al., 2010; FAO, 2008).

Com o objetivo de definir níveis seguros para a ingestão de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, o comitê conjunto da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization* - FAO) e Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) de peritos em aditivos de alimentos (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* - JECFA) avalia os dados toxicológicos disponíveis para determinados medicamentos veterinários, e preconiza valores para a ingestão diária aceitável (IDA) de uma determinada droga. Com base nesses valores, e através do *Codex Alimentarius*, foram estabelecidos os limites máximos

---

de resíduos (LMR) para antimicrobianos em alimentos de origem animal (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999; EUROPEAN UNION, 1996).

Em diferentes países, sistemas de monitoramento e controle da qualidade do leite são instituídos de modo a gerar informações precisas quanto à utilização de antimicrobianos na medicina veterinária e relatar a verdadeira exposição da população a seus resíduos no leite, sendo que métodos analíticos simples, sensíveis e confiáveis, devem estar disponíveis e serem continuamente desenvolvidos e validados para a detecção desses resíduos em alimentos, particularmente no leite bovino (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

A validação analítica significa a confirmação através de estudos experimentais e o fornecimento de evidência objetiva de que os critérios para determinada aplicação do método foram cumpridos (EUROPEAN UNION, 2002). Métodos analíticos devem atender a critérios de desempenho de acordo com a finalidade pretendida, em que o processo de validação permite assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (GOWIK, 2009).

As técnicas cromatográficas são alvos primordiais dos procedimentos de validação, uma vez que envolvem monitoramentos concernentes à saúde pública, ambiental, comércio exterior e controle de qualidade de produção de alimentos (RIBANI et al., 2004).

Na análise de resíduos em alimentos, metodologias multirresíduo são especialmente requeridas, uma vez que permitem a pesquisa de diferentes compostos em um mesmo procedimento analítico. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes detectores é extensamente empregada para confirmação e quantificação de antimicrobianos em matrizes alimentares como o leite (MAMANI; REYES; RATH, 2009; KANTIANI; FARRÉ; BARCELO, 2009; STOLKER; ZUIDEMA; NIELEN, 2007).

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento e a validação de método multirresíduo para análise de resíduos de diferentes classes antimicrobianas (método multiclasse) em leite bovino, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, arranjo de diodos, e espectrometria de massas.

---

## **CAPÍTULO 1**

### **Revisão Bibliográfica**



## 1 Antimicrobianos

### 1.1 Classe das sulfonamidas

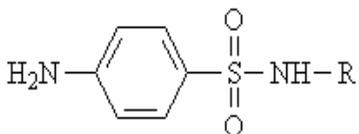
Em 1908, previamente à descoberta da penicilina por Alexander Fleming, o químico austríaco Paul Gelmo, trabalhando com alcatrão de carvão em sua tese de doutorado na Universidade de Viena, sintetizou o composto *p*-aminobenzenosulfonamida (TAGGART, 1993).

Na década de 1930, o médico e cientista alemão Gerhard Domagk demonstrou que o agente *p*-sulfamidocrisoidina, um corante que se comprovou ser um pró-fármaco inativo do composto *p*-aminobenzenosulfonamida, é capaz de influenciar a evolução de uma infecção bacteriana. Sob a patente de nome Prontosil Rubrum®, o *p*-sulfamidocrisoidina foi o primeiro antimicrobiano disponível comercialmente. A descoberta e o desenvolvimento das sulfonamidas deram início a uma nova era da medicina (TAGGART, 1993).

As sulfonamidas compreendem uma classe de agentes antimicrobianos formada por compostos sintéticos derivados da *p*-aminobenzenosulfonamida. Esses compostos são caracterizados por um grupo arilo contendo um grupo amino e um grupo sulfonamida em posição *para* (NIESSSEN, 1998; ALABURDA et al., 2007).

Existem aproximadamente trinta sulfonamidas e as suas estruturas variam conforme a substituição no grupo sulfonamida (CAI et al., 2008). As sulfonamidas são substâncias de estrutura análoga à do ácido *p*-aminobenzoico (PABA) e atuam como antagonistas competitivos, uma vez que impedem a utilização desse ácido pelas bactérias durante a síntese do ácido fólico, necessário para a síntese dos precursores de ácidos nucleicos bacterianos (ALABURDA et al., 2007).

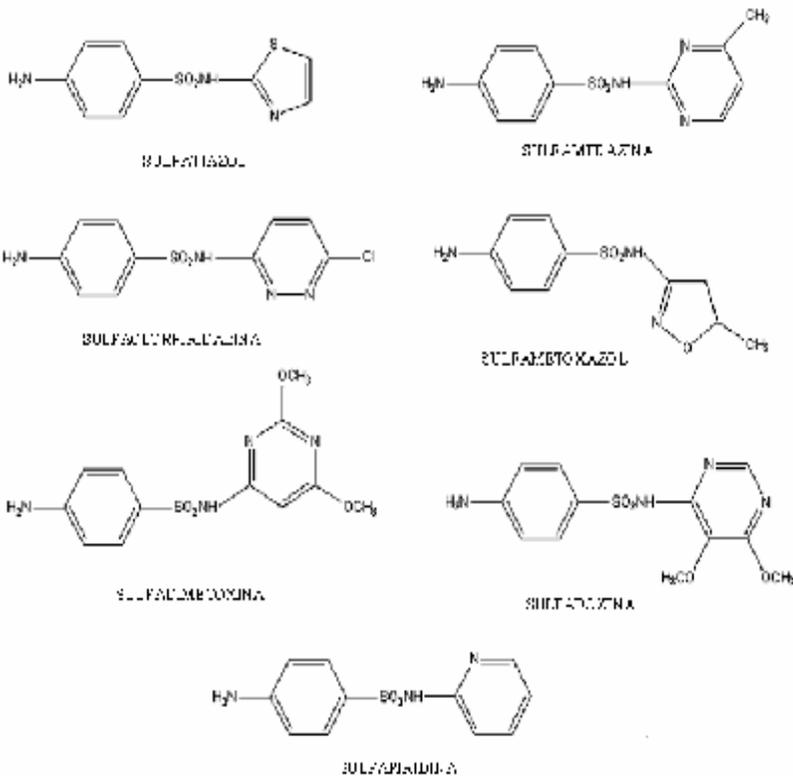
A estrutura geral da classe é apresentada na Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Estrutura geral dos antimicrobianos da classe das sulfonamidas. Fonte: (RANG et al., 2007).

Na medicina humana, a classe das sulfonamidas é rotineiramente empregada no tratamento de infecções das vias respiratórias, como bronquites, infecções do trato urinário, e infecções de ouvido. Muitas sulfonamidas estão clinicamente disponíveis, como a sulfamerazina, sulfatiazol, sulfadiazina, sulfametazina, sulfaclopiridazina, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfadoxina, sulfadimidina, sulfametopirazina, sulfassalazina, e sulfametoxazol em combinação com trimetoprima, como cotrimoxazol (RANG et al., 2007).

Alguns dos principais fármacos da classe das sulfonamidas estão apresentados na Figura 1.2.



**Figura 1.2.** Antimicrobianos da classe das sulfonamidas. Fonte: (Zheng et al., 2008).

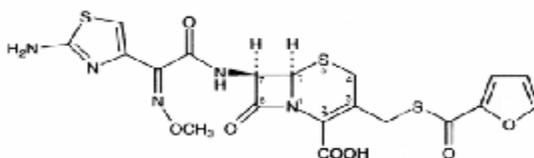
## 1.2 Classe das cefalosporinas

Originalmente descobertas na década de 1940, pelo professor Giuseppe Brotzu, em pesquisas com fungos do gênero *Cephalosporium*, as cefalosporinas compreendem uma classe antimicrobiana com fármacos relacionados quimicamente às penicilinas, pertencendo igualmente à classe de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. A estrutura das cefalosporinas é baseada no ácido aminocefalosporânico, enquanto que a das penicilinas é baseada no ácido penicilânico. A diferença estrutural, embora pequena, é suficiente para impedir a ação das penicilinases sobre as cefalosporinas (RANG et al., 2007).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuam na parede celular bacteriana, impedindo a biossíntese da porção peptídeoglicano da parede, o que prejudica a sua morfologia causando desequilíbrio osmótico com o meio externo, e o rompimento da membrana celular (SOUZA, 2008). As cefalosporinas são classificadas como de primeira, segunda, terceira e quarta geração, com base na ordem cronológica de síntese e comercialização dos fármacos (GALERA et al., 2010).

A modificação de cadeias laterais no ácido aminocefalosporânico dá origem às diferentes cefalosporinas, além de causar variações no espectro de ação destes antibióticos. Cefalosporinas de primeira geração são mais eficazes contra bactérias Gram-positivo, ao contrário de cefalosporinas de terceira e quarta gerações, que apresentam maior atividade contra bactérias Gram-negativo (GALERA et al., 2010).

O ceftiofur é uma cefalosporina de terceira geração de uso exclusivo em medicina veterinária, e apresenta uma estrutura molecular com espectro de atividade contra patógenos Gram-positivo e Gram-negativo, incluindo micro-organismos resistentes a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (SOUZA, 2008). A estrutura do ceftiofur está representada na Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Estrutura química do ceftiofur. Fonte: (Berendsen et al., 2009).

### 1.3 Classe das quinolonas

A classe das quinolonas, de grande relevância clínica, teve origem em 1962, com a descoberta casual de um protótipo antibacteriano, o ácido nalidíxico, um composto obtido durante a síntese do agente antimalárico cloroquina. Apesar do composto ácido não ter sido extensamente utilizado no tratamento de infecções sistêmicas, este agente serviu como alicerce químico para que mais de mil análogos fossem identificados (O'DONNELL; GELONE, 2004).

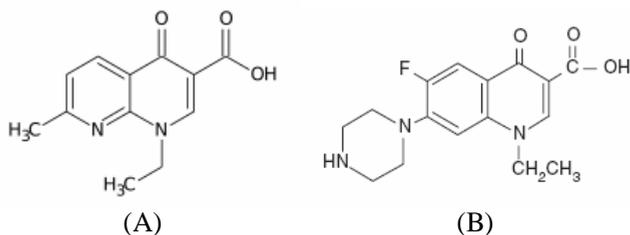
As quinolonas compreendem uma classe de antimicrobianos sintéticos, em que os compostos apresentam dois tipos de estrutura em anel, sendo um, o núcleo naftiridina, com átomos de nitrogênio na posição 1 e 8 do anel, e outro, um núcleo com apenas um átomo de nitrogênio na posição 1, chamado núcleo quinolina. Todos os compostos, quinolinas e naftiridinas, contêm um oxigênio cetônico ligado ao carbono da posição 4, e a cadeia lateral de um ácido carboxílico ligado ao carbono da posição 3 da cadeia principal (PARK; KIM; BARK, 2002).

Modificações na estrutura dos anéis possibilitaram a obtenção de outras quinolonas como o ácido oxolínico e a cinoxacina, sintetizados na década de 1970. Nesse mesmo período, a síntese do ácido pipemídico, com a inclusão de um grupo piperazínico na molécula, representou um importante avanço no desenvolvimento das quinolonas sintéticas (O'DONNELL; GELONE, 2004).

Importantes alterações realizadas na estrutura molecular desse ácido, como a inclusão de um átomo de flúor na posição 6 da cadeia, originou as chamadas fluorquinolonas, com a síntese do norfloxacino, o primeiro agente antimicrobiano pertencente a esse novo grupo (PARK; KIM; BARK, 2002).

A classe das fluorquinolonas tem destacada importância no tratamento de infecções causadas por diferentes tipos de bactérias, compreendendo os únicos agentes antimicrobianos sintéticos a competirem com os compostos  $\beta$ -lactâmicos em uso clínico. Além disso, nenhuma outra classe antimicrobiana cresceu tão rapidamente ou foi assiduamente desenvolvida por centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas (O'DONNELL; GELONE, 2004).

A Figura 1.4 mostra as estruturas químicas do ácido nalidíxico, que contém o núcleo naftiridina, e do norfloxacino, a primeira fluorquinolona sintetizada contendo o núcleo quinolina na estrutura do anel.



**Figura 1.4.** Estruturas químicas do (A) ácido nalidíxico, com núcleo naftiridina, e (B) norfloxacino, com núcleo quinolina. Adaptado de: (MARAZUELA; MORENO-BONDI, 2004; TUREL, 2002).

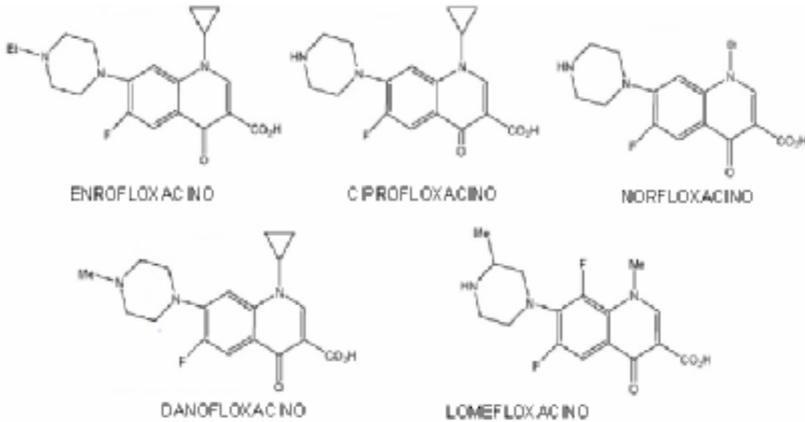
As fluorquinolonas atuam na inibição de duas enzimas topoisomerases envolvidas na síntese do DNA bacteriano e que são essenciais para sua replicação. As enzimas DNA-girase e topoisomerase IV têm como funções romper a ligação entre as fitas da dupla hélice de DNA e posicionar no local da ruptura uma outra fita dupla, reparando esses locais simultaneamente (RANG et al., 2007).

Esses fármacos interagem com o complexo formado entre a DNA-girase e o DNA bacteriano, ou com um complexo formado entre a topoisomerase IV e o DNA bacteriano, para criar modificações conformacionais que resultam na inibição de suas atividades enzimáticas. O novo complexo formado, fluorquinolona – enzima – DNA, bloqueia progressivamente a sua replicação, inibindo a síntese normal do DNA bacteriano, e resultando na morte rápida da célula do micro-organismo (RANG et al., 2007).

As fluorquinolonas são muito ativas contra micro-organismos Gram-negativo, embora menos ativas contra micro-organismos Gram-positivo. Os agentes dessa classe são muito utilizados no tratamento de uma variedade de infecções, incluindo infecções do trato urinário, de tecidos moles, infecções respiratórias, ósseas, articulares, febre tifóide, doenças sexualmente transmissíveis, prostatites, pneumonias, bronquites e sinusites (TUREL, 2002).

Diversas fluorquinolonas, como enrofloxacino, danofloxacino, lomefloxacino, marbofloxacino e sarafloxacino, foram especialmente desenvolvidas para aplicações veterinárias, enquanto que outras fluorquinolonas, como ciprofloxacino e norfloxacino, são restritas para uso em humanos (MARAZUELA; MORENO-BONDI, 2004).

As principais fluorquinolonas empregadas nas medicações humana e veterinária são apresentadas na Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Antimicrobianos da classe das fluorquinolonas. Adaptado de: (Benito-Peña et al., 2008).

## 2 Antimicrobianos na atividade leiteira

A medicina veterinária emprega, desde a década de 1950, um grande número de drogas veterinárias de modo a promover a saúde e sustentar a intensiva produção de animais (KANTIANI; FARRÉ; BARCELO, 2009; TUREL, 2002).

O uso excessivo e abusivo de antimicrobianos em animais produtores de alimentos resulta na presença desses fármacos em alimentos destinados ao consumo humano, como carnes bovinas, suínas e de frango, carne de peixe, ovos, mel e leite (BOSCHER et al., 2010).

Os riscos associados ao uso incorreto de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto na prática veterinária, são motivos de preocupação entre órgãos governamentais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

O uso de antimicrobianos, com prescrição do médico veterinário ou sob sua supervisão, é assumido como sendo, em geral, altamente responsável. Todavia, assim como diversos medicamentos de uso

humano, muitos medicamentos veterinários podem ser facilmente comprados e administrados em desrespeito ao uso indicado (COMMITTEE ON DRUG USE IN FOOD ANIMALS, 1999).

Antimicrobianos são extensamente empregados na medicina veterinária para o tratamento de infecções que afetam frequentemente o gado leiteiro, como a mastite bovina, pneumonia, diarreia e artrite bacterianas. Durante o tratamento da mastite bovina com antimicrobianos, estes compostos são encontrados em altas concentrações no leite, impossibilitando a sua utilização na alimentação humana e animal (KANTIANI; FARRÉ; BARCELO, 2009).

A terapia antimicrobiana prevê períodos de carência para a produção de alimento a partir do animal tratado, sendo esse período variável conforme o fármaco, a via de administração, a posologia e a espécie animal. Na prática veterinária, o descumprimento do período de carência e da via de administração é resultado da necessidade de uma recuperação mais rápida da doença, buscando-se manter a produção do alimento de origem animal (COMMITTEE ON DRUG USE IN FOOD ANIMALS, 1999).

Os antimicrobianos podem ser administrados por via intravenosa, intramuscular, ou subcutânea, ou ainda, aplicados por meio de infusões intramamárias e intrauterinas. Também podem ser administrados por via oral, através de alimentos ou água de consumo dos animais, ou localmente, com aplicações sobre a pele (KANTIANI; FARRÉ; BARCELO, 2009). Em dosagens subterapêuticas, esses fármacos podem aumentar a taxa de crescimento dos animais, gerando benefícios econômicos para o produtor. Enquanto os fármacos protegem sua saúde, os animais são capazes de utilizar os nutrientes de sua dieta para o seu crescimento (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

Em 2006, a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais foi banida na União Européia e em outros países, como o Brasil, de modo a garantir a segurança humana e animal, ficando o uso desses agentes restrito à prevenção e ao tratamento de infecções. Entretanto, a utilização inapropriada ainda é comum em países em desenvolvimento, onde problemas de resistência microbiana são geralmente reportados (BOSCHER et al., 2010; MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

Após a disseminação comercial da classe, antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, como as cefalosporinas, passaram a ser utilizados como suplementos na alimentação animal e promotores de crescimento (KANTIANI; FARRÉ; BARCELO, 2009).

Fármacos da classe das sulfonamidas, como a sulfamonometoxina, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfamerazina e sulfaquinoxalina, bem como os antimicrobianos enrofloxacino e danofloxacino, da classe das quinolonas, são comumente empregados no tratamento de infecções gastrointestinais e respiratórias em gado leiteiro (CHUNG et al., 2009).

As sulfonamidas são administradas a bovinos com objetivo terapêutico e profilático ou, ainda, como estimulante de crescimento (FELTRIN et al, 2007). São indicadas em casos de infecções causadas por micro-organismos do gênero *Pasteurella* e também enterobactérias (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001).

Em 1991, a FDA aprovou o uso de ceftiofur no tratamento de infecções respiratórias em animais. Cefalosporinas são indicadas no tratamento da mastite bovina, causada por *Staphylococcus aureus*, e no tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Salmonella*, *Escherichia coli*, e *Pasteurella*, a exemplo do ceftiofur (SOUZA, 2008).

As principais fluorquinolonas utilizadas na medicina veterinária compreendem a flumequina, o enrofloxacino, o sarafloxacino, o danofloxacino, o orbifloxacino, e o marbofloxacino. O norfloxacino, aprovado para uso exclusivo em humanos, tem sido empregado de maneira inadequada na prática veterinária, devido ao seu amplo espectro de ação e baixo custo. Todavia, o enrofloxacino é o principal antimicrobiano fluorquinolona aplicado em animais produtores de alimentos (WOODWARD, 2004).

Fármacos antimicrobianos podem se tornar ineficazes no tratamento de infecções devido aos mecanismos de resistência microbiana. Além disso, a indisponibilidade de novos fármacos pode afetar a saúde humana e comprometer o bem estar animal, acarretando declínio na produção de alimentos de origem animal. Em indústrias alimentícias, com a diminuição das opções de antimicrobianos, a capacidade de produção e o retorno econômico não seriam mantidos (COMMITTEE ON DRUG USE IN FOOD ANIMALS, 1999).

Agentes antimicrobianos são utilizados na prática veterinária a mais de cinco décadas, sendo parte integrante e consolidada da pecuária moderna. Como resultado dos efeitos benéficos de sua aplicação para a produção industrial, prevenção de infecções e manutenção da saúde, o uso de antimicrobianos na prática veterinária somente poderá ser limitado pelo seu custo, ou por medidas legais que restrinjam e regulem suas aplicações (PÉREZ-TRALLERO; ZIGORRAGA, 1995).

### **3 Resíduos de antimicrobianos em leite**

Contaminantes orgânicos podem estar presentes em alimentos, de forma natural ou antropogênica, sendo divididos em quatro categorias: pesticidas, substâncias químicas de persistência ambiental, toxinas naturalmente presentes, e medicamentos veterinários. Entre as drogas veterinárias, os agentes antimicrobianos são amplamente utilizados para a prevenção e tratamento das doenças infecciosas em animais produtores de alimentos (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

Resíduos podem ser definidos como quantidades mínimas (traço) de uma substância presente em uma matriz, como um alimento ou um fluido biológico, após algum tipo de administração. Os níveis das substâncias encontram-se na faixa de concentração de parte por bilhão (ppb) ou parte por trilhão (ppt) (BRABANDER et al., 2009).

Resíduo de droga veterinária corresponde à droga, fração da droga, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação, e impurezas, que permanecem no alimento originário de animais tratados. Esses compostos podem ser detectados em diferentes tecidos animais, por períodos variáveis, após a administração de um medicamento veterinário (FAO, 1996).

Resíduos de antimicrobianos em leite geralmente são atribuídos à violação dos períodos de carência previstos com a administração desses agentes. Adicionalmente, podem estar presentes devido à contaminação fraudulenta do alimento (KANG`ETHE et al., 2005). Os riscos à saúde incluem o desenvolvimento de alergias e reações de hipersensibilidade, além de indução de resistência a antimicrobianos em micro-organismos patogênicos (BOSCHER et al., 2010).

Esses fármacos quando provenientes de alimentos podem causar alterações na atividade metabólica da microbiota intestinal humana, responsável pela produção de vitamina K, absorção de íons, homeostase do sistema imunológico e proteção contra patógenos externos (JEONG; SONG; CHO, 2009). Também podem provocar tonturas, dores de cabeça e de ouvido. Sabe-se ainda que o uso prolongado desses agentes em baixas doses pode resultar na transferência de bactérias patogênicas resistentes do alimento para o consumidor (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

A exposição a fármacos antimicrobianos está associada a diferentes graus de reações alérgicas, que variam de leves urticárias e eczemas cutâneos, a angioedemas e anafilaxia com risco de morte (KANG`ETHE et al., 2005).

As quinolonas compreendem um importante grupo de antimicrobianos sintéticos, largamente empregado no tratamento de infecções do gado bovino, a exemplo da flumequina e enrofloxacino. Existem evidências de que a exposição em longo prazo a pequenas concentrações desses fármacos pode ter efeito negativo na densidade óssea. Não obstante, a presença de seus resíduos em leite gera problemas de saúde pública, devido à resistência microbiana induzida em populações bacterianas intestinais (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

O principal efeito tóxico associado à classe das fluorquinolonas é verificado sobre as cartilagens articulares, com casos de artropatias relacionados a fármacos fluorquinolonas em diversas espécies animais, incluindo ratos, cachorros e pássaros (WOODWARD, 2004).

A presença de resíduos de sulfonamidas em leite é de grande preocupação, uma vez que alguns dos compostos, como sulfamerazina, são suspeitos de serem carcinogênicos, sendo relatados casos de desenvolvimento de tumores na tireóide de roedores (HUANG; QIU; YUAN, 2009; WOODWARD, 2004).

Assim como as penicilinas, os antimicrobianos cefalosporinas podem induzir reações de hipersensibilidade, levando a erupções de pele, urticárias, dermatite de contato, e necrose tóxica epidérmica. Todavia, as reações cutâneas graves, assim como os casos de anafilaxia, são bastante raros (WOODWARD, 2004). Pesquisas com gado leiteiro demonstraram que a administração intramamária de ceftiofur no tratamento da mastite, alcança no leite concentrações maiores do que a permitida para esse composto no alimento (SMITH et al., 2004).

Resíduos de drogas veterinárias em leite podem ainda causar prejuízos consideráveis para as indústrias de laticínios, sendo que pequenas quantidades de antibióticos podem inibir culturas lácteas sensíveis, utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos derivados (PAIGE, 1999).

#### **4 Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em leite**

A garantia da inocuidade de alimentos ofertados ao consumo humano, quanto à presença de resíduos de drogas veterinárias, agroquímicos e contaminantes ambientais, é possibilitada pelo controle e monitoramento desses resíduos em todas as etapas de produção do alimento (BRASIL, 1999).

Os principais objetivos do monitoramento de resíduos de drogas veterinárias são assegurar o fornecimento de alimentos seguros e saudáveis, e assumir ações regulatórias nos casos de identificação de produtos em não conformidade com a legislação vigente (STOLKER; ZUIDEMA; NIELEN, 2007).

O *Codex Alimentarius* é referência mundial para consumidores, produtores e processadores de alimentos, agências de controle alimentar e para o comércio internacional de alimentos. Seus parâmetros alimentares preconizados são reconhecidos internacionalmente como as melhores medidas estabelecidas para proteger a saúde humana contra riscos decorrentes de contaminantes em alimentos (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

A agência americana reguladora de medicamentos e alimentos (FDA – *Food and Drug Administration*) e a Comunidade Européia estabeleceram níveis de tolerância para resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal, de acordo com dados toxicológicos e recomendações de ingestão diária aceitável (IDA) preconizadas no *Codex Alimentarius*, e com base no desempenho de tecnologias analíticas disponíveis. Esses níveis são referidos como limite máximo de resíduo (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

Limite máximo de resíduo (LMR) de drogas veterinárias corresponde à máxima concentração resultante do uso de uma droga veterinária, que é legalmente permitida em um alimento, sendo expressa em  $\text{mg kg}^{-1}(\text{L}^{-1})$  ou  $\mu\text{g kg}^{-1}(\text{L}^{-1})$ . Esse valor é determinado conforme o tipo e quantidade da substância, e considerado sem risco de toxicidade para a saúde humana, expressa pela ingestão diária aceitável (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

A ingestão diária aceitável (IDA), expressa em miligrama da droga por quilograma de peso corpóreo, é a dose diária que se ingerida durante toda a vida do indivíduo não oferece risco à saúde, com base nos conhecimentos disponíveis até o momento para cada droga. Valores de IDA estão sempre sujeitos a revisões, desde que novas informações tornem-se disponíveis (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

A Comissão Européia (EC – *European Commission*), através da Regulamentação do Conselho nº 2377/90, de 26 de junho de 1990, estabelece limites máximos de resíduos para substâncias farmacologicamente ativas de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, como carne bovina, mel, leite, ovos e carne de pescados (EUROPEAN UNION, 1990).

Através da Diretiva do Conselho 96/23/EC, de 29 de Abril de 1996, a União Européia instrui medidas para monitorar resíduos em alimentos de origem animal. A Diretiva regulamenta o controle de resíduos e contaminantes ambientais, como corantes, elementos químicos e drogas veterinárias. As substâncias e seus resíduos são divididos em dois grupos: o grupo A, referente às substâncias que apresentam ação anabólica e substâncias de uso proibido, como hormônios, cloranfenicol e compostos  $\beta$ -agonistas; e o grupo B, referente a todas as drogas veterinárias registradas e de uso lícito (EUROPEAN UNION, 1996).

Através do Anexo I da EC nº 2377/90, a Comissão Européia preconiza limites máximos de resíduos em leite bovino para cinco antimicrobianos da classe das quinolonas. Os limites máximos permitidos correspondem a  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  para resíduos de danofloxacino,  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  para resíduos de enrofloxacino, lomefloxacino e ciprofloxacino,  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  para resíduos de flumequina e  $75 \mu\text{g L}^{-1}$  para resíduos de marbofloxacino (EUROPEAN UNION, 1990).

Com relação às sulfonamidas, a Regulamentação nº 2377/90 estabelece o LMR referente ao somatório de todos os resíduos sulfonamidas no leite, sendo que o valor não pode ultrapassar a concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . O limite máximo de resíduo para o antimicrobiano ceftiofur em leite é  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , dez vezes inferior ao limite máximo permitido para esse composto na carne bovina (EUROPEAN UNION, 1990).

As baixas concentrações referidas como limites máximos de resíduos para antimicrobianos demandam o desenvolvimento e comprovação de métodos analíticos que sejam suficientemente sensíveis e reprodutíveis, de modo a monitorar esses compostos no leite bovino (HERMO et al., 2008).

O cálculo dos valores de ingestão diária aceitável e a elaboração de limites máximos de resíduos não são suficientes para garantir a saúde do consumidor. É imprescindível que estes limites sejam aferidos continuamente na prática veterinária, e os períodos de carência após a aplicação de antimicrobianos sejam respeitados. Programas de monitoramento de resíduos devem ser implementados de modo a verificar a qualidade dos alimentos de origem animal (WOODWARD, 2004).

O Brasil representa um dos mais importantes parceiros comerciais da União Européia, compreendendo uma extensa área de pecuária, e necessita, portanto, de ações de monitoramento como uma

imposição no contexto do comércio internacional e da segurança alimentar, particularmente no que se refere ao leite brasileiro (BRASIL, 1999). A produção nacional de leite tem aumentado nos últimos anos, sendo que, somente no ano de 2010 foram produzidos mais de trinta mil litros de leite bovino, um crescimento superior a 23% em relação à produção desse alimento em 2005 (EMBRAPA, 2011).

No âmbito nacional, qualquer medicamento para uso veterinário deve ser previamente aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e durante sua aplicação, deve-se respeitar o período de carência do medicamento, de modo que, quando da permanência de seu resíduo no produto final, este ocorra em concentrações menores do que o LMR estabelecido para o mesmo (ANVISA, 2001).

Frente ao desafio de produzir e comercializar um produto puro e de qualidade, priorizando a saúde do consumidor, e em concordância às exigências nacionais e internacionais, o MAPA instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC. Anualmente, amostras da produção brasileira de leite são coletadas e monitoradas, junto aos estabelecimentos sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF), no âmbito do Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Leite – PCRCL, subprograma do PNCRC (BRASIL, 1999).

Considerando a legislação pertinente à agropecuária, no Brasil, cabe ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, através da Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA, planejar, normatizar, coordenar e supervisionar as atividades de defesa agropecuária, em especial saúde animal e sanidade vegetal; a fiscalização e inspeção de produtos, derivados, subprodutos e resíduos de origem animal e vegetal; a fiscalização de insumos agropecuários; a fiscalização higiênico-sanitária dos serviços prestados na agricultura e na pecuária; análise laboratorial como suporte às ações de defesa agropecuária; e certificação sanitária, animal e vegetal (BRASIL, 2007).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC/Animal foi instituído pela Portaria Ministerial nº. 51, de 06 de maio de 1986, adequado pela Portaria Ministerial nº. 527, de 15 de agosto de 1995, e alterado pela Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999).

O PCRCL do Ministério da Agricultura atua nas fases iniciais da cadeia produtiva do leite, sendo responsável pelo monitoramento e

controle de resíduos a partir do produtor rural, nas localidades sob SIF, até a chegada e recepção do leite na indústria (BRASIL, 2007).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou através da Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet, a fim de avaliar a presença e os níveis de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos, assegurando a qualidade do produto processado. O PAMVet fiscaliza periodicamente amostras de leites disponíveis comercialmente em todo o território brasileiro (BRASIL, 2003).

Resíduos de antimicrobianos podem ser monitorados através de diversos métodos analíticos, que podem ser agrupados em três classes com base no princípio empregado: microbiológico, imunoquímico e físico-químico. Métodos microbiológicos baseados no crescimento de micro-organismos são aplicados na triagem de amostras para a detecção de resíduos. Métodos imunoquímicos compreendem imunoensaios que permitem detectar e quantificar esses compostos de forma rápida e seletiva. Métodos físico-químicos baseiam-se na identificação e separação cromatográfica dos resíduos, seguido por quantificação espectrométrica por meio de fluorescência, ultravioleta, arranjo de diodos, e espectrometria de massas (BRABANDER et al., 2009).

Em análise de alimentos, métodos multirresíduo envolvendo diferentes agentes e classes farmacológicas são necessários a fim de melhorar o desempenho dos programas de monitoramento, ampliando seu escopo, e viabilizando a análise simultânea de maior número de fármacos (TUERK et al., 2006).

A Comunidade Européia, através da Diretiva nº 657 de 2002, que preconiza critérios de desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados, estabelece a distinção entre métodos de triagem (*screening*) e métodos confirmatórios. Métodos de triagem, compreendendo ensaios microbiológicos e imunoensaios, são mais rápidos e de menor custo em comparação aos confirmatórios, e apresentam, geralmente, uma sensibilidade adequada (McEVOY, 2002).

Métodos de triagem compreendem métodos empregados para detecção de uma substância, ou classe de substâncias, a um determinado nível de interesse, permitindo analisar uma grande quantidade de amostras. Métodos confirmatórios são capazes de prover informações completas ou complementares permitindo a identificação inequívoca e a quantificação de uma substância (EUROPEAN UNION, 2002).

Métodos confirmatórios compreendem, principalmente, a cromatografia líquida com detecção espectrométrica (McEVOY, 2002).

A Comunidade Européia considera a análise cromatográfica com detecção por fluorescência e arranjo de diodos, técnica confirmatória para análise de resíduos em alimentos. Todavia, somente a espectrometria de massas é capaz de gerar informação precisa quanto à estrutura química do composto (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009).

## **5 Ensaios qualitativos e métodos de triagem de resíduos antimicrobianos em leite**

Como medida inicial para assegurar a qualidade do leite, os programas de controle de resíduos incluem testes de triagem em amostras da produção desse alimento. Testes de triagem são métodos de análise qualitativos que detectam a presença residual de um composto ou analito em uma determinada matriz de interesse. Os testes devem ser simples, eficientes, e economicamente viáveis, permitindo analisar grande número de amostras em menor tempo (MAMANI, 2007).

Visando melhorar o custo e a eficiência das análises de resíduos em um laboratório, metodologias multirresíduo são desenvolvidas com a finalidade de maximizar o número de analitos a ser pesquisado em um único procedimento analítico (STUBBINGS et al., 2005).

Métodos de triagem geralmente não distinguem compostos de uma mesma classe antimicrobiana, porém promovem uma estimativa quantitativa do total de resíduos presente no alimento (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

Técnicas qualitativas para análise de resíduos em alimentos de origem animal, para as quais podem ser demonstradas, de forma documentada e rastreável, a validação analítica e uma porcentagem de falso negativo inferior a 5%, com um erro  $\beta$  ao nível de interesse ( $CC\beta$ ), são consideradas adequadas para fins de triagem. No caso de suspeita de resultado não conforme, o resultado deve ser confirmado através de método confirmatório (EUROPEAN UNION, 2002).

Ensaio imunológico ou de inibição microbiana são comumente empregados para identificar a presença de resíduos antimicrobianos em leite. Métodos de triagem tradicionais baseiam-se na inibição do crescimento de micro-organismos devido aos resíduos desses agentes presentes na amostra teste. Estes ensaios estão baseados em processos de difusão ou turvação do meio (MAMANI, 2007).

No Brasil, diversos testes de triagem estão disponíveis para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite, na forma de kits comerciais de fácil realização, de menor custo e mecanizados, possibilitando a análise de várias amostras ao mesmo tempo. Exemplos de kits de triagem baseados na inibição do crescimento microbiano compreendem o BR-Test<sup>®</sup> (*Brilliant Black Reduction Test*), o Delvotest-P<sup>®</sup>, Delvotest-SP<sup>®</sup> e Copan<sup>®</sup> (TENÓRIO et al., 2009).

Métodos de triagem de resíduos de sulfonamidas em leite incluem, principalmente, ensaios microbiológicos e imunoenzimáticos (RODRÍGUEZ et al., 2010).

Kits do tipo Charm<sup>®</sup> baseiam-se na afinidade específica entre sítios das moléculas dos antimicrobianos e determinados sítios receptores na parede celular de microrganismos. São exemplos deste tipo de teste: Charm Cowside Test<sup>®</sup>, Charm I Test<sup>®</sup> e Charm II Test<sup>®</sup>. Alguns testes utilizam a técnica de ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), como CITE Sulfa-trio<sup>®</sup> para sulfametazina, sulfatiazol, sulfametazina; Lactek<sup>®</sup> para  $\beta$ -lactâmicos, sulfametazina e gentamicina; e Snap test<sup>®</sup> para  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina (TENÓRIO et al., 2009).

Na literatura, diversos trabalhos científicos empregam métodos de triagem para determinação de antimicrobianos em leite, com ensaios qualitativos baseados em diferentes princípios de detecção.

Bilandzic et al. (2011) empregaram imunoenaios e ensaios microbiológicos para análise de antimicrobianos em leite, pesquisando compostos das classes sulfonamidas, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, anfenicóis, aminoglicosídeos e macrolídeos. Já Tenório et al. (2009) e Stead et al. (2008) utilizaram kits comerciais baseados na inibição de crescimento microbiológico para análise de resíduos de sulfonamidas,  $\beta$ -lactâmicos, e gentamicina em leite.

Diversas metodologias empregam ensaios imunoenzimáticos para análise de resíduos de  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e quinolonas em leite, como as metodologias descritas por Zhu et al. (2011), Adrian et al. (2009), Xie et al. (2009) e Adrian et al. (2008), em que foram utilizados ensaios baseados na detecção por imunofluorescência e ultravioleta, a partir de técnicas como ELISA e FLISA (*Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay*).

Rodríguez et al. (2010) e Schneider (2004) empregaram a detecção fluorimétrica para triagem de resíduos de sulfonamidas em leite e enrofloxacina em carne de frango, respectivamente.

Outras metodologias empregam ensaios eletroquímicos para detecção de antimicrobianos, como Barbosa et al. (2011) e Cáceres et al. (2010), que analisaram resíduos de sulfonamidas e ceftiofur em leite bovino, a partir de detecção voltamétrica.

Resultado positivo em um ensaio qualitativo (triagem) indica que pode ter sido superado o valor do LMR e a amostra deve ser analisada novamente através de métodos confirmatórios, fornecendo fundamento para uma eventual ação regulatória (ZHU et al., 2011; MAMANI, 2007).

## **6 Métodos confirmatórios para análise de antimicrobianos em alimentos**

Métodos confirmatórios para determinação de resíduos orgânicos e contaminantes devem fornecer informações sobre a estrutura química do analito. Os métodos baseados apenas em análise cromatográfica, sem o emprego de detecção espectrométrica, são inadequados para uso confirmatório. No entanto, se a técnica não apresentar especificidade adequada e suficiente, a combinação de processos analíticos, como limpeza e concentração de analitos, separação cromatográfica, e detecção espectrométrica, pode ser empregada para alcançar a especificidade requerida (EUROPEAN UNION, 2002).

As técnicas de separação cromatográfica com detecção por fluorescência e detecção por arranjo de diodos em modo *full-scan* podem ser aplicadas para análise confirmatória de resíduos e contaminantes de uso lícito, para compostos que exibem fluorescência nativa ou após processos de derivatização, e para compostos com máxima absorção na faixa espectral monitorada, respectivamente (EUROPEAN UNION, 2002).

A relação custo eficiência de um processo analítico é a questão chave para laboratórios envolvidos na pesquisa de resíduos. A automatização dos processos é introduzida de modo a acelerar diversas etapas analíticas, todavia, a instrumentação é onerosa, sendo necessário um grande número de amostras de modo a justificar a despesa de capital (KARCI; BALCIOGLU, 2009).

Devido às baixas concentrações e à complexidade das matrizes biológicas, alimentares e ambientais em que os antimicrobianos podem ser encontrados, técnicas sensíveis e seletivas devem ser empregadas para extração e análise desses compostos (STUBBINGS et al., 2005).

Metodologias capazes de analisar diferentes substâncias em apenas um procedimento analítico são preferíveis no monitoramento de resíduos. Entretanto, as propriedades químicas dos compostos antimicrobianos tornam laboriosa a identificação de um solvente extrator e eluente cromatográfico comum às diferentes classes antimicrobianas (HERMO et al., 2008).

Na literatura, diversas metodologias são descritas para a análise confirmatória de antimicrobianos em leite e em outros alimentos de origem animal, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BRABANDER et al., 2009).

### 6.1 Análise de cefalosporinas, sulfonamidas e quinolonas

Na pesquisa de antimicrobianos, a principal técnica empregada é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (FL), ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD), espectrometria de massas (MS), e espectrometria de massas em modo *tandem* (MS/MS) (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005).

A análise de resíduos em leite compreende, geralmente, etapas de desproteíntização da matriz com solventes orgânicos acidificados, e concentração e purificação de analitos através de extração em fase sólida (*solid fase extraction* – SPE) (MARAZUELA; MORENO-BONDI, 2004).

As cefalosporinas, assim como as penicilinas, compreendem o grupo de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, uma das classes antimicrobianas mais pesquisadas em alimentos. A determinação de seus resíduos é principalmente realizada através de cromatografia líquida, sendo mais comum a detecção por espectrometria de massas e espectrometria de massas em modo *tandem* (KINSELLA et al., 2009).

A detecção por arranjo de diodos também tem sido reportada (Gentili, Perret e Marchese, 2005). A determinação do antimicrobiano ceftiofur é geralmente realizada através da detecção do seu derivado metabólico, o desfuroilceftiofur, como nas metodologias descritas por Makeswaran, Patterson e Points (2005), Becker, Zittlau e Petz (2003) e Tyczkowska et al. (1993).

Em análises multirresíduo, Kantiani et al. (2009), Becker, Zittlau e Petz (2004) e Holstege et al. (2002) desenvolveram e validaram metodologias para identificação e quantificação de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em leite bovino, empregando extração em fase sólida e

análises por CLAE-MS/MS. Resíduos de penicilinas (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V) e cefalosporinas (ceftiofur, cefazolina, cefoperazona, cefalexina) foram pesquisados pelos autores. Já Sorensen e Snor (2000) e Keever, Voyksner e Tyczkowska (1998) pesquisaram resíduos de ceftiofur em leite bovino, empregando CLAE com detecção por ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (MS), respectivamente.

Na pesquisa de resíduos de quinolonas em leite, diversas metodologias foram desenvolvidas e validadas de acordo com a Decisão nº 657 de 2002 da Comunidade Européia, empregando principalmente a técnica de cromatografia líquida.

Em análises por CLAE-FL/UV, Herrera-Herrera, Hernández-Borges e Rodríguez-Delgado (2009), Idowu e Peggins (2004), Marazuela e Moreno-Bondi (2004) e Ho et al. (2004) desenvolveram metodologias para determinação de resíduos de fluorquinolonas em leite bovino, caprino e ovino. Já Hermo et al. (2008) empregaram diferentes técnicas de detecção para análise desses compostos em leite bovino, validando a metodologia desenvolvida por CLAE nos detectores FL, UV, MS e MS/MS. Resíduos de marbofloxacino, sarafloxacino, danofloxacino, enrofloxacino e ciprofloxacino foram pesquisados pelos autores.

A detecção por fluorescência é um método não destrutivo, que apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade. A técnica é principalmente aplicada na quantificação de resíduos de fluorquinolonas, que apresentam fluorescência nativa devido à estrutura de seus compostos. Compostos que não apresentam fluorescência nativa devem sofrer o processo de derivatização com reagentes derivatizantes específicos (SCHNEIDER; DONOGHUE, 2002).

A detecção por espectrometria de massas e espectrometria de massas em modo *tandem* também tem sido empregada para análise de fluorquinolonas em leite (Zhang, Ren e Bao, 2009; Bogialli et al., 2008; Hoof et al., 2005). Entretanto, a análise desses compostos por CLAE-DAD é menos empregada (Cinquina et al., 2003).

Resíduos de antimicrobianos sulfonamidas são bastante pesquisados em leite. Huang, Qiu e Yuan (2009), Gamba et al. (2009) e Furusawa (2000) utilizaram a cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos para análise desses compostos em leite bovino. Os autores pesquisaram resíduos de sulfadiazina, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfamonometoxina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina, e validaram as metodologias de acordo com a Decisão

nº 657/2002 da Comunidade Européia. Outros autores pesquisaram sulfonamidas em leite empregando CLAE com detecção por espectrometria de massas e espectrometria de massas em modo *tandem* (Zheng et al., 2008; Rhijn et al., 2002). Já Rodriguez et al. (2010), Alaburda et al. (2007) e Lamba et al. (2005) empregaram CLAE com detecção por fluorescência para análise desses compostos na mesma matriz.

Compostos sulfonamidas não apresentam fluorescência nativa, necessitando, portanto, do procedimento de derivatização em análises com detecção por fluorescência. O reagente fluorescamina é largamente empregado como derivatizante de aminas primárias em determinações fluorimétricas. Esse composto não fluorescente reage com aminas primárias gerando compostos químicos derivados, que sob excitação molecular a 390 nm, emitem forte fluorescência a 475-490 nm. A reação de derivatização ocorre rapidamente em temperatura ambiente de 25°C (RODRÍGUEZ et al., 2010).

A derivatização com fluorescamina de resíduos de sulfonamidas foi empregada por Lamba et al. (2005), Stoev e Michailova (2000), Posyniak, Zmudzki e Mitrowska (2005), Maudens, Zhang e Lambert (2004), e Gehring et al. (2006), em pesquisas com leite, carnes bovinas e de frango, mel e pescados, respectivamente. A sensibilidade e a seletividade da derivatização fluorimétrica disseminou a utilização da técnica de detecção por fluorescência (LAMBDA et al.; 2005).

Métodos confirmatórios multirresíduo para análise de antimicrobianos são geralmente desenvolvidos para análise de compostos relacionados quimicamente, de uma mesma classe de fármacos. Entretanto, são poucos os procedimentos capazes de analisar, a partir da mesma metodologia analítica, compostos de diferentes classes antimicrobianas em matrizes alimentares complexas, como o leite (STUBBINGS et al., 2005).

Com a ampla utilização de fármacos na prática veterinária, diferentes classes antimicrobianas têm sido pesquisadas em alimentos, sendo necessárias metodologias analíticas confiáveis e abrangentes (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005).

De modo a ampliar o escopo de programas de monitoramento de resíduos em alimentos, metodologias multirresíduo foram desenvolvidas para a análise de diferentes classes de antimicrobianos em leite, empregando principalmente a técnica de cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas.

Em análises por CLAE-MS/MS, Bohm, Stachel e Gowik (2009) validaram método de análise de 47 antimicrobianos em leite, compreendendo quinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, macrolídeos e um derivado diaminopirimidina (trimetropina). Koesukwiwat, Jayanta e Leepipatpiboon (2007) e Martins-Júnior et al. (2007) pesquisaram resíduos de compostos  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclinas, macrolídeos e do antiparasitário pirimetamina em leite, empregando extração em fase sólida previamente à análise cromatográfica. Já Aguilera-Luiz et al. (2008) validaram método para quantificação de resíduos de quinolonas, sulfonamidas, macrolídeos, anti-helmínticos e uma tetraciclina, em leite, empregando CLAE-MS. Os autores analisaram dez amostras de leite obtidas comercialmente, sendo que em duas amostras foi detectada a presença de resíduos antimicrobianos abaixo do limite de quantificação do método.

Em análises multiclasse de antimicrobianos em leite, Chung et al. (2009) publicaram um protocolo para determinação de resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas em leite bovino e de cabra, através de ensaios microbiológicos e análises por CLAE-FL, e Mamani, Reys e Rath (2009) validaram metodologia para análise de três tetraciclinas, três sulfonamidas e cloranfenicol em leite bovino, por CLAE-DAD. Resíduos de fluorquinolonas, ceftiofur e sulfonamidas também foram pesquisados em alimentos de origem animal como carnes de frango e suína, fígado e músculo bovinos, peixes, ovos e mel, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (BERNAL et al., 2009; FORTI e SCORTICHINI, 2009; THOMPSON; NOOT, 2005; LAMBA et al., 2005; HELLER et al, 2002).

Diversos autores descrevem a análise de quinolonas em alimentos de origem animal, como carnes suínas, de pescado, e de frango. Rambla-Alegre et al. (2010), Ramos et al. (2003) e Pecorelli et al. (2003) pesquisaram resíduos de ácido oxolínico, flumequina, enrofloxacino, difloxacino e sarafloxacino em carnes suína e de pescado, empregando extração em fase sólida e análises por CLAE-FL/DAD.

Em pesquisa com carne de frango, Schneider e Donoghue (2002) empregaram CLAE-FL com confirmação por espectrometria de massas em modo *tandem*, para determinação de resíduos de ciprofloxacino e enrofloxacino. Já Bogialli et al. (2009) validaram método para determinação de sete quinolonas em ovos, empregando extração aquosa e análise por CLAE-MS/MS.

Pesquisas referentes à análise de ceftiofur em alimentos de origem animal, com exceção do leite, são raramente encontradas na

literatura. Embora existam poucos trabalhos recentes sobre a quantificação desse composto em matrizes alimentares, alguns autores (Beconi-Barker et al. 1995) pesquisaram o antimicrobiano e seu derivado metabólico, o desfuroilceftiofur, em tecidos animais como músculo, rins, gordura e fígado suínos, empregando CLAE-DAD. Mais recentemente, Mastovska e Lightfield (2008) desenvolveram uma metodologia multirresíduo para análise de onze antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, entre eles o ceftiofur na forma dissulfeto de cisteína desfuroilceftiofur, em fígado bovino.

Com relação à pesquisa de sulfonamidas em alimentos, Costi, Sicilia e Rubio (2010) e Posyniak, Zmudzki e Mitrowska (2005) desenvolveram e validaram metodologia para análise de sulfonamidas em carnes suína, bovina, de frango, de peru, e de cordeiro, empregando CLAE-FL, a partir da derivatização com fluorescamina. Hoff, Barreto e Kist (2009) analisaram resíduos de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina em rim bovino, empregando eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser, para triagem das sulfonamidas, e CLAE-MS/MS para confirmação dos resíduos. Já Ito et al. (2000) e Stoev e Michailova (2000) pesquisaram resíduos de sulfonamidas em músculo, fígado e rim bovinos, empregando derivatização pré-coluna com fluorescamina, em análises por CLAE-MS/MS e CLAE-FL, respectivamente.

Resíduos de sulfonamidas foram pesquisados em ovos por Forti e Scortichini (2009) e Heller et al. (2002), através de metodologias por CLAE-MS/MS e CLAE-UV/MS/MS, respectivamente. Em análises por cromatografia líquida, Bernal et al. (2009), Maudens, Zhang e Lambert (2004) e Thompson e Noot (2005) pesquisaram sulfonamidas em mel, empregando detecções por fluorescência e espectrometria de massas em modo *tandem*, respectivamente. Nas análises por fluorescência, os autores empregaram o reagente fluorescamina para a derivatização das sulfonamidas.

Em análises com pescados, Gehring et al. (2006) desenvolveram um método multirresíduo para análise de quatorze sulfonamidas em amostras de salmão, bagre e camarão, empregando a cromatografia líquida com detecção por fluorescência.

Na análise de resíduos multiclasse, Li et al. (2008) e Li et al. (2006) desenvolveram metodologias por CLAE-MS/MS, para determinação de quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas em músculos suíno e de frango, e carne de camarão, respectivamente.

## **7 Análise de ceftiofur, sulfonamidas e quinolonas em matrizes ambientais e biológicas**

Resíduos de ceftiofur, sulfonamidas e quinolonas também foram pesquisados em solos, águas residuais, lodos de esgoto, estrumes e fluídos biológicos, como urina e plasma sanguíneo.

Em análises ambientais, Zhao, Dong e Wang (2010) e Karci e Balcioglu (2009) determinaram resíduos de sulfonamidas, fluorquinolonas e tetraciclina em solos agrícolas e estrumes de aves, suínos e gado, de oito províncias da China, e de três províncias da Turquia, respectivamente. Os autores empregaram análises por CLAE-FL para detecção de fluorquinolonas e sulfonamidas, e CLAE-DAD/MS para detecção de tetraciclina.

Pesquisando resíduos antimicrobianos em águas residuais e lodo de esgoto, Tong et al. (2009), Lillenberg et al. (2009) e Ben et al. (2008) desenvolveram metodologias multiclasse para análise de sulfonamidas, fluorquinolonas, tetraciclina e cloranfenicol, empregando extração em fase sólida e análises por CLAE-MS/MS. Em trabalhos com a mesma matriz, Raich-Montiu et al. (2007), McClure e Wong (2007) e Renew e Huang (2004) pesquisaram resíduos de sulfonamidas, fluorquinolonas, macrolídeos e trimetropina, empregando CLAE-FL/MS. Já Puig et al. (2007) pesquisaram resíduos de ceftiofur em águas residuais empregando eletroforese capilar.

A análise de antimicrobianos em fluídos biológicos também é reportada, como nas metodologias de Puig et al. (2007), Tuerk et al. (2006), Jacobson, Martinod e Cunningham (2006) e Garcés et al. (2006). Os autores desenvolveram métodos para análise de cefalosporinas, quinolonas e sulfonamidas em urina e plasmas sanguíneos de bovino e suíno, empregando análises por CLAE-UV, CLAE-FL e CLAE-MS.

## **8 Validação analítica**

A validação de métodos analíticos compreende a comprovação, através de fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido foram atendidos (INMETRO, 2003).

De modo a estabelecer regras gerais para os métodos analíticos oficiais de triagem e confirmatórios, quanto à análise de resíduos e

contaminantes em alimentos, a União Européia publicou no Jornal Oficial das Comunidades Européias, a Decisão do Conselho (EC) nº 657 de 2002, relativa aos critérios de desempenho de métodos analíticos e à interpretação dos resultados (EUROPEAN UNION, 2002).

Os parâmetros analíticos, ou critérios de desempenho, normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de trabalho; sensibilidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação; limite de decisão ( $CC\alpha$ ); capacidade de detecção ( $CC\beta$ ); e robustez. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção de uso do método (RIBANI et al., 2004; EUROPEAN UNION, 2002).

### *Seletividade*

A seletividade compreende a habilidade do método em distinguir o analito de outras substâncias. É uma característica predominantemente de detecção, em que o método distingue a resposta de um analito na presença de possíveis interferentes de matriz (EUROPEAN UNION, 2002).

### *Linearidade e faixa de trabalho*

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de trabalho (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005).

A linearidade é verificada através das curvas analíticas de calibração, determinadas para cada analito, realizando-se a regressão linear da equação da reta, obtida em função da concentração do analito *versus* a resposta do equipamento de medição, por exemplo, a área de um pico cromatográfico. Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y, variável dependente) e a concentração do analito (eixo x, variável independente) (RIBANI et al., 2004).

Essa relação produz uma equação de regressão linear  $y = ax + b$ , que relaciona as duas variáveis  $x$  e  $y$  e gera os coeficientes de regressão  $a$  (inclinação da curva) e  $b$  (intersecção da curva analítica com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ). A equação é válida para um determinado intervalo de concentração do analito. O grau de concordância entre a variável independente e a variável dependente é dado pelo coeficiente de

correlação  $r^2$ , que deve assumir valores próximos de -1 e +1 (INMETRO, 2003). Valores de  $r^2$  iguais ou superiores a 0,99 e 0,90 são recomendados, respectivamente pela ANVISA e pelo INMETRO (RIBANI et al., 2004).

Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva analítica utiliza-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), quando ( $r^2 = 1$ ) e os pontos encontram-se dentro da faixa linear, pode-se provar que  $(S/Q) = a$ , para todos os valores experimentais utilizados para construir a curva. Nos casos em que ( $r^2 < 1$ ) e dentro da faixa linear, o resultado para a razão (S/Q) é aproximadamente o valor de  $a$ . Conforme normas da IUPAC, os pontos cujas razões (S/Q) não ultrapassam mais de 5% do coeficiente angular da reta são considerados dentro da faixa linear (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; PRIMEL, 2003).

### *Sensibilidade*

A sensibilidade do método analítico é representada pela inclinação da curva analítica, sendo expressa pelo coeficiente angular da reta (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; EUROPEAN UNION, 2002). A sensibilidade corresponde à variação da resposta do detector em função da concentração do analito (RIBANI et al., 2004).

### *Precisão*

A precisão, definida em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Na repetibilidade, os ensaios são realizados sob as mesmas condições, enquanto que na reprodutibilidade essas condições são variadas, por exemplo, diferentes dias (RIBANI et al., 2004).

A precisão é expressa como o desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV), das medições realizadas nas análises (RIBANI et al., 2004; EUROPEAN UNION, 2002). No caso de métodos de análise de substâncias com LMR na faixa de 10 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , o coeficiente de variação das medições de concentração, não deve exceder o valor de 23%, sendo que a reprodutibilidade do método deve ser inferior a reprodutibilidade obtida na concentração equivalente a 0,5 vezes o LMR (EUROPEAN UNION, 2002).

*Exatidão*

A exatidão de um método analítico pode ser estimada através da análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do analito, através de ensaios de recuperação. Esse parâmetro avalia o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados de ensaios e um valor de referência aceito (INMETRO, 2003).

Para métodos de análise de resíduos em concentrações na faixa de 10 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , a média das recuperações em cada nível de fortificação deverá compreender valores entre 70% e 110% (BRASIL, 2009).

A exatidão de medições em métodos quantitativos confirmatórios é aceita em termos de recuperação de analitos adicionados em matriz isenta. Para compostos pesquisados em concentrações superiores a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , as recuperações podem variar de -20% a +10% (EUROPEAN UNION, 2002).

*Limite de detecção e limite de quantificação*

O limite de detecção representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada pelo método utilizado, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação representa a concentração mínima em que um analito pode ser quantificado em uma amostra com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais. Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação geralmente é expresso em unidades de concentração. Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação podem ser utilizados o método visual, o método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica (EUROPEAN UNION, 2002).

O método visual consiste na adição de concentrações conhecidas da substância de interesse na matriz a ser analisada, até que seja possível distinguir entre ruído e sinal analítico a menor concentração adicionada. No método da relação sinal-ruído, amostras de branco da matriz (matriz isenta da substância de interesse) e amostras adicionadas de padrão são analisadas. Através da comparação entre as amostras, é estabelecida uma concentração mínima em que a substância gera uma relação sinal-ruído de 3:1, para o limite de detecção e uma relação sinal-ruído de 10:1 para o limite de quantificação (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; RIBANI et al., 2004).

O método baseado em parâmetros da curva analítica utiliza-se da expressão  $LD = 3,3 \times (s/S)$  e  $LQ = 10 \times (s/S)$  onde,  $s$  é a estimativa do

desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  o coeficiente angular da curva (RIBANI et al., 2004).

#### *Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ )*

Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) de um método analítico significa o limite a partir do qual se pode concluir, com uma probabilidade de erro  $\alpha$ , que uma amostra é não conforme. A capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) compreende a menor concentração de uma substância que pode ser detectada, identificada e quantificada em uma amostra, com uma probabilidade de erro  $\beta$  (EUROPEAN UNION, 2002).

No caso de substâncias com limites máximos estabelecidos, a capacidade de detecção é a menor concentração em que o método é capaz de detectar concentrações de limites permitidos, com uma certeza estatística de  $1-\beta$  (EUROPEAN UNION, 2002).

#### *Robustez*

A robustez de um método analítico compreende a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações nos seus parâmetros. As mudanças avaliadas refletem as alterações que podem ocorrer quando o método é executado em diferentes instrumentos ou por diferentes analistas, ou alterações no ambiente de análise (RIBANI et al., 2004; EUROPEAN UNION, 2002).

A robustez verifica o nível de reprodutibilidade dos resultados obtidos em análises sob diferentes condições, por exemplo, diferentes laboratórios e analistas, alterações operacionais do equipamento, tempo de extração, diferentes lotes de reagentes, e variações da amostra. Se os resultados das variações estiverem dentro dos limites de exatidão e precisão aceitáveis, o método apresenta robustez e as variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2003).

---

---

## **CAPÍTULO 2**

**Desenvolvimento de método analítico para determinação de  
ceftiofur, fluorquinolonas e sulfonamidas em leite**

## **Desenvolvimento de método analítico para determinação de ceftiofur, fluorquinolonas e sulfonamidas em leite**

### **Resumo**

O objetivo do trabalho foi desenvolver método para análise de resíduos de fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, arranjo de diodos e espectrometria de massas. Diferentes solventes e condições de pH foram empregados para precipitação protéica e extração dos resíduos, sendo avaliados os sinais analíticos e a estabilidade dos compostos, e a presença de interferentes da matriz. Extrações líquido-líquido e em fase sólida com adsorventes de fase reversa e de troca iônica foram empregadas. A fase móvel composta por água ultra pura 2% ácido acético (pH=3) e acetonitrila (100%) permitiu a melhor separação dos compostos. A extração líquido-líquido apresentou melhor resultado na recuperação e separação cromatográfica dos analitos em comparação à extração em fase sólida. Na análise de sulfonamidas por fluorescência, a derivatização com fluorescamina apresentou melhores resultados para os extratos aquosos em comparação aos extratos orgânicos. A extração com água ultra pura 10% TCA foi eficiente na análise multirresíduo dos compostos em leite. Na análise confirmatória por CLAE-MS/MS, compostos fluorquinolonas e sulfonamidas foram determinados no leite a partir da extração com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% ácido fórmico. Os métodos desenvolvidos permitiram a detecção e identificação dos compostos a partir de extrações líquido-líquido em leite.

**Palavras-chave:** Leite, sulfonamidas, ceftiofur, fluorquinolonas, multirresíduo.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso extensivo de antimicrobianos na medicina veterinária acarreta a presença de resíduos em alimentos de origem animal como o leite, gerando riscos à saúde do consumidor e prejuízos na cadeia produtiva do alimento. Não obstante, problemas concernentes à segurança alimentar têm se tornado um fenômeno recorrente (STOLKER; BRINKMAN, 2005; McEVOY, 2002).

Antimicrobianos fluorquinolonas têm ampla aplicação na medicina humana e veterinária no tratamento de infecções das vias urinárias, pulmonares e digestórias. Sua utilização em animais produtores de alimentos tem gerado grande preocupação devido ao crescente número de casos de resistência microbiana a esses fármacos (HERRERA-HERRERA; HERNÁNDEZ-BORGES; RODRÍGUEZ-DELGADO, 2009; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2002).

Sulfonamidas são principalmente utilizadas no tratamento de infecções respiratórias em gado bovino, e seus resíduos podem contaminar o leite, causando reações de hipersensibilidade a partir de sua ingestão. Um dos fármacos dessa classe, a sulfamerazina, apresenta potencial carcinogênico, com relatos de tumores de tireóide em roedores. Outras sulfonamidas são associadas a reações alérgicas em humanos (LAMBA et al.; 2005).

O antimicrobiano ceftiofur, da classe das cefalosporinas, apresenta amplo espectro de ação contra micro-organismos Gram-positivo e Gram-negativo, sendo bastante empregado no tratamento da mastite bovina e infecções sistêmicas causadas por *Salmonella*, *E. coli*, e *Pasteurella* (SORENSEN e SNOR, 2000).

Diversas técnicas são descritas para análise de ceftiofur, sulfonamidas e fluorquinolonas em leite, sendo principalmente empregada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta, arranjo de diodos, fluorescência e espectrometria de massas (STOLKER; BRINKMAN, 2005).

Em análise de alimentos, a matriz alimentar pode interferir no sinal do detector, reduzindo sua seletividade. Para análise de resíduos em leite, é necessário um bom procedimento de limpeza da amostra, ou a utilização de um detector com maior seletividade para os compostos pesquisados (LAMBA et al.; 2005). Em métodos multirresíduo, diferenças estruturais entre compostos antimicrobianos tornam laboriosos os procedimentos de extração e purificação comuns aos analitos (TUERK et al.; 2006).

O pH do meio exerce grande influência na especiação química de diferentes compostos antimicrobianos, devido à presença de grupamentos funcionais ácidos e básicos em suas moléculas (RENEW; HUANG, 2004).

Um método eficiente para análise de resíduos de fluorquinolonas deve permitir a quantificação e a confirmação dos compostos, apresentar baixos níveis de detecção, bem como permitir a análise de múltiplos analitos. A técnica de análise de fluorquinolonas em detector de fluorescência é altamente sensível, reprodutível e não destrutiva (SCHNEIDER; DONOGHUE, 2002). Em análises por fluorescência, a identificação e a quantificação são realizadas com base no tempo de retenção e intensidade do sinal cromatográfico (MAUDENS; ZHANG; LAMBERT, 2004).

As sulfonamidas podem ser analisadas por fluorescência através da derivatização pré ou pós-coluna com o reagente fluorescamina (RAICH-MONTIU et al., 2007). Drogas veterinárias com grupamentos básicos, como as sulfonamidas, contêm grupos funcionais amino que podem se ligar a íons hidrogênio formando cátions. Extratos contendo esses compostos podem ser purificados e concentrados através de extração em fase sólida (STUBBINGS et al., 2005). A combinação de extração líquido-líquido com extração em fase sólida e derivatização com fluorescamina tem efeito na seletividade e na detecção de moléculas não polares e pouco polares contendo uma função amina primária (MAUDENS; ZHANG; LAMBERT, 2004).

As propriedades de aminoácidos aromáticos conferem fluorescência às proteínas do leite, como as caseínas ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\kappa$ ) e as proteínas do soro  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, que apresentam pelo menos um resíduo do aminoácido triptofano, que sob fonte de radiação apresenta fluorescência nativa (HERBERT et al.; 1999).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e otimização de método analítico para determinação de antimicrobianos fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur em leite bovino pasteurizado, com a detecção e identificação dos compostos por CLAE-FL/DAD e confirmação por CLAE-MS/MS.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Padrões analíticos e reagentes

Padrões dos antimicrobianos ceftiofur (CEF), enrofloxacino (ENR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), norfloxacino (NOR), e lomefloxacino (LOM) (Fluka<sup>®</sup> Steinheim, Alemanha). Sulfamerazina (SMR), sulfatiazol (STZ), sulfapiridina (SPY), sulfametoxazol (SMA), sulfaclorpiridazina (SCP), sulfadimetoxina (SDMX), sulfadoxina (SDX) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> St. Louis, Estados Unidos). Reagente derivatizante fluorescamina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> St. Louis, Estados Unidos), todos com 99% de pureza.

Os ácidos fosfórico, tricloroacético (TCA), fórmico (AF), clorídrico e acético, acetato de sódio, hidróxido de sódio e hidróxido de amônio, e os solventes orgânicos acetato de etila e acetona, de pureza analítica (Vetec<sup>®</sup> Brasil). Reagente tampão fosfato (pH=7) (Lafan<sup>®</sup> Brasil). Solventes acetonitrila e metanol, pureza grau HPLC (Vetec<sup>®</sup> Brasil). Para as análises cromatográficas, os solventes orgânicos foram filtrados previamente ao uso em membrana PTFE com 0,45 µm de diâmetro de poro, da marca Millipore<sup>®</sup> (Massachusetts, Estados Unidos), e água deionizada foi purificada em sistema Milli-Q Millipore<sup>®</sup> para obtenção de água ultra pura.

### 2.2 Preparo das soluções padrões e estudo da estabilidade

Em análises por CLAE-FL/DAD, a estabilidade dos analitos foi verificada em diferentes condições de solvente e temperatura. As soluções estoque dos padrões, na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, foram preparadas em metanol, acetonitrila e em mistura acetonitrila: água ultra pura 1:1 (v/v), e avaliadas nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias, com armazenamento nas temperaturas de 8 e -12 °C.

A estabilidade das soluções padrões foi avaliada através da resolução (tempo de retenção/largura da base do pico -  $T_R/W$ ) e intensidade (altura do pico) do sinal analítico dos compostos a partir das análises cromatográficas.

Para fortificação de amostras, soluções mix dos compostos ceftiofur, enrofloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, norfloxacino, lomefloxacino, sulfamerazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfametoxazol, sulfaclopiridazina, sulfadimetoxina e sulfadoxina, foram preparadas diariamente na concentração de  $1.000 \text{ ng mL}^{-1}$ , a partir da diluição de alíquotas das soluções estoque dos padrões em água ultra pura.

Para determinação dos íons precursores  $[M+H]^+$  e das transições ( $m/z$ ) dos antimicrobianos nas análises por CLAE-MS/MS, as soluções estoque dos padrões foram preparadas individualmente na concentração de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , através de dissolução em acetonitrila, e armazenadas à temperatura de  $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Soluções intermediárias na concentração de  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila foram preparadas para determinação dos parâmetros operacionais em espectrometria de massas, através de infusão direta dos padrões no sistema ESI-MS/MS para verificação do sinal analítico e identificação dos compostos pesquisados.

### 2.3 Amostras

Amostras de leite fluído bovino pasteurizado, obtido em mercado local e de mesma marca comercial, foram fortificadas com os analitos e submetidas ao processo de extração.

### 2.4 Extração em fase sólida

Na etapa de limpeza de amostra e concentração de analitos, foram empregados os cartuchos de extração em fase sólida (*solid fase extraction* – SPE): de fase reversa com adsorvente  $\text{C}_{18}$ /octadecil/18%, com 500 mg de massa de adsorvente e 6 mL de volume de reservatório, da marca Applied Separations® (Allentown, Estados Unidos); e de troca iônica, com adsorvente amino quaternário trocador de ânions (SBAE – *strongly basic anion exchanger*), e adsorvente ácido benzeno sulfônico trocador de cátions (SACE – *strongly acid cation exchanger*), ambos com 500 mg de massa de adsorvente e 6 mL de volume de reservatório, da Macherey-Nagel® (Düren, Alemanha).

## 2.5 Equipamentos e condições cromatográficas

### 2.5.1 Análises por CLAE-FL/DAD

As análises por CLAE-FL/DAD foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu® (Kyoto, Japão) equipado com bomba de alta pressão modelo LC-20AT, desgaseificador modelo DGU-20A<sub>5</sub>, forno para coluna modelo CTO-20A e injetor manual com loop de 20 µL, controlador de sistema modelo CBM-20A, e software LCsolutions® versão 1.21. A detecção dos compostos foi realizada em detector de fluorescência modelo RF-10A<sub>XL</sub>, e detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão).

A separação cromatográfica dos compostos foi realizada em coluna analítica de fase reversa Shim-pack Shimadzu C<sub>18</sub>, da série CLC-ODS(M), de dimensões 250 mm x 4,6 mm, com diâmetro de partícula interna de 5 µm, equipada com pré-coluna analítica Shimadzu C<sub>18</sub>, série G-ODS, de dimensões 10 mm x 4 mm. A detecção por fluorescência foi realizada monitorando os comprimentos de onda de excitação/emissão em 280/440 nm para as fluorquinolonas, e em 405/495 nm para as sulfonamidas.

Para a análise de sulfonamidas, 1 mL do extrato a ser analisado no cromatógrafo foi derivatizado com 100 µL de fluorescamina 0,1% (p/v) em acetona. O tempo da reação de derivatização foi de 40 minutos, à temperatura de 25°C. A detecção do ceftiofur foi realizada em detector de arranjo de diodos, através do monitoramento do comprimento de onda de máxima absorção do composto em 280 nm.

Diferentes composições de fase móvel foram testadas de modo a otimizar a separação cromatográfica dos analitos, sendo empregada uma fase aquosa acidificada (A) e uma fase orgânica (B). Diferentes ácidos foram utilizados para a acidificação da fase aquosa, em diferentes condições de pH. Os ácidos fórmico, fosfórico e acético foram avaliados quanto à separação dos analitos nos valores de pH 2,5, 3,0 e 3,5, verificados através de pHmetro (Mettler Toledo® MP 220). Para fase orgânica (B) foram avaliados os solventes metanol e acetonitrila.

A corrida cromatográfica foi realizada em modo de eluição gradiente, com variações na força do solvente de modo a obter a melhor separação cromatográfica dos compostos pesquisados. O fluxo da fase móvel foi fixado em 1 mL min<sup>-1</sup>, com volume de injeção de amostra de 20 µL.

### 2.5.2 Análises por CLAE-MS/MS

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Alliance HT 2795 Waters<sup>®</sup> (Milford, Estados Unidos) equipado com bomba quaternária e amostrador automático, com interface para espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Quattro Micro<sup>™</sup> API Micromass<sup>®</sup> (Manchester, Reino Unido), com fonte de ionização por electrospray (ESI – *electrospray ionization*) e bomba de infusão.

A separação dos compostos foi realizada em coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> Symmetry Waters<sup>®</sup> (Milford, Estados Unidos), de dimensões 75 x 4,6 mm, com diâmetro de partícula interna de 3,5 µm, equipada com coluna de guarda Symmetry C<sub>18</sub> (2.1 x 10 mm).

O sistema ESI-MS/MS foi operado no modo positivo, empregando gás nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação, e gás argônio como gás de colisão. O fluxo do gás de dessolvatação foi fixado em 400 L h<sup>-1</sup>, à temperatura de 350 °C. A temperatura da fonte de ionização foi mantida em 120 °C, e a voltagem do capilar fixada em 3 kV. A detecção dos compostos foi realizada através do monitoramento de múltiplas reações (MRM – *multiple reaction monitoring*), com tempo de medida de massa (*dwel time*) de 0,1 segundos.

Os parâmetros operacionais do espectrômetro de massas foram otimizados a partir de infusões de soluções individuais dos padrões, através de sonda de amostragem equipada com bomba de seringa. Para cada antimicrobiano, a voltagem do cone e a energia de colisão foram determinadas através de infusões de soluções intermediárias na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>. Um íon precursor [M+H]<sup>+</sup> e dois produtos de transição (*m/z*) foram determinados e monitorados para cada composto, com a confirmação dos analitos através da relação massa/carga de seus fragmentos *m/z*, após a quebra molecular do íon precursor selecionado a partir da biblioteca de dados do software Masslynx<sup>®</sup> versão 4.1, da Micromass<sup>®</sup> (Manchester, Reino Unido).

Duas composições de fase móvel foram testadas para a separação cromatográfica dos analitos, sendo uma composta por fase móvel aquosa (A) água ultra pura 0,1% ácido fórmico e fase orgânica (B) acetonitrila, e a outra composta por fase móvel aquosa (A) água ultra pura 0,1% ácido fórmico e fase orgânica (B) acetonitrila 0,1% ácido fórmico. O fluxo da fase móvel foi fixado em 0,4 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de amostra foi 20 µL.

## **2.6 Desproteínização de amostras e análise de interferentes por CLAE-FL/DAD**

A desproteínização do leite foi realizada na etapa de preparo de amostra para remoção de interferentes da matriz. Os solventes metanol, acetonitrila, água ultra pura e a mistura metanol: acetonitrila 1:1 (v/v) foram avaliados quanto à precipitação proteica na amostra.

Para avaliação do agente acidificante, os solventes foram acidificados com os ácidos fórmico, fosfórico, acético e tricloroacético, nas concentrações 10, 20 e 30%, e adicionados individualmente em amostras de 1 g da matriz isenta de analitos, e da matriz fortificada com os analitos na concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup>. Após homogeneização (Biomixer<sup>®</sup> QL-901), as amostras foram submetidas à centrifugação a 1.000 g (Centrífuga Janetzki<sup>®</sup> K24) por 40 minutos. O precipitado proteico foi descartado e os sobrenadantes límpidos foram filtrados duas vezes em membranas de PTFE descartáveis com 0,45 µm de poro, e injetados no cromatógrafo. A eficiência do solvente na desproteínização do leite foi avaliada quanto à presença de interferentes nos cromatogramas.

## **2.7 Análises por CLAE-FL/DAD**

### **2.7.1 Extração em fase sólida**

A extração em fase sólida (SPE) foi realizada previamente às análises por CLAE-FL, de acordo com Gamba et al. (2009), Hermo et al. (2008), Lamba et al. (2005), Stubbings et al. (2005), Maudens, Zhang e Lambert (2004), Renew e Huang (2004), para limpeza da amostra e purificação de analitos em cartuchos de SPE.

Na extração em fase sólida, foram testadas diferentes composições de solventes para condicionamento, lavagem e eluição dos analitos em adsorventes dos tipos C<sub>18</sub>, amino quaternário e ácido benzeno sulfônico. Previamente à extração, foi empregada a etapa de desproteínização de amostras com os solventes metanol 10% TCA, água ultra pura 10% TCA e acetonitrila 10% TCA.

A Tabela 2.1 apresenta as etapas de condicionamento e eluição realizadas em cada material adsorvente para extração em fase sólida dos resíduos antimicrobianos.

## Capítulo 2

**Tabela 2.1.** Condicionamento e eluição empregados nos diferentes adsorventes para extração em fase sólida de resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas em leite pasteurizado.

Adsorvente	Condicionamento	Eluição
C <sub>18</sub>	(1) 5 mL acetato de etila + 5 mL acetato de etila: acetona: ácido acético (10:10:1, v/v)	(a) 5 mL MeOH: MeCN: ácido acético (5:5:1, v/v)  (b) 5 mL MeCN 1% ácido acético
	(2) 5 mL MeOH + 5 mL água ultra pura	(c) 5 mL MeCN: sol. 5% acetato de amônio (10: 0,5, v/v)
Ácido benzeno sulfônico	(3) 5 mL MeOH + 5 mL água ultra pura	(d) 5 mL MeOH : MeCN (1:1, v/v)
	(4) 5 mL MeOH + 5 mL tampão fosfato pH 7,0	(e) 5 mL MeOH  (f) 5 mL NH <sub>4</sub> OH 40%: MeOH (1:1, v/v)
Amino quaternário	(5) 5 mL MeOH + 5 mL água Milli-Q + 5 mL acetato de etila	(g) 5 mL HCl 1M
	(6) 5 mL MeOH + 5 mL água ultra pura	(h) 5 mL acetato de sódio 0,1M 10% NaCl

Após a centrifugação dos extratos da matriz fortificada com os analitos, os sobrenadantes foram transferidos para os cartuchos de SPE pré-condicionados com solventes, ou misturas de solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, acetato de etila e acetona, conforme as metodologias descritas por Kinsella et al. (2009), Tuerk et al. (2006) e Renew e Huang (2004).

A eluição dos compostos foi avaliada para diferentes condições de solvente e pH, a partir das recuperações obtidas para os analitos, expressas em valores de área dos picos cromatográficos.

### 2.7.2 Extração líquido-líquido

Para extração dos resíduos, os seguintes solventes extratores foram avaliados: metanol 10% TCA, acetonitrila 10% TCA, água ultra pura 10% TCA, metanol: acetonitrila 1:1 (v/v), metanol e acetonitrila.

Amostras de 1 g de leite pasteurizado foram pesadas em tubos de polipropileno e homogeneizadas através de agitação (Biomixer<sup>®</sup> QL-901) por 20 segundos. As amostras foram fortificadas com os analitos na concentração do LMR para cada antimicrobiano, a partir da solução mix dos padrões em água ultra pura, na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>. Após homogeneização, as amostras foram deixadas em repouso por 20 minutos, permitindo o equilíbrio entre os antimicrobianos e a matriz.

Para a extração dos compostos, 2 mL de solvente extrator foram adicionados aos tubos, seguido de agitação por 30 segundos. Os extratos foram transferidos para tubos de vidro de centrífuga, e os resíduos lavados sequencialmente com 3 vezes de 0,5 mL de água ultra pura, sendo acrescentados aos extratos. Os extratos foram submetidos à centrifugação a 1.000 g (Centrífuga Janetzki<sup>®</sup> K24) por 40 minutos. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes submetidos novamente à centrifugação, sob as mesmas condições. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes coletados em seringas de polipropileno, para filtração em membranas PTFE descartáveis de 0,45 µm de poro.

Os filtrados foram coletados em tubos de vidro e uma alíquota de 1 mL foi retirada para derivatização das sulfonamidas com reagente fluorescamina 0,1% (p/v) em acetona. A proporção entre solução do reagente derivatizante e amostra foi investigada através da adição de alíquotas de 0,1 a 0,5 mL do reagente. Após 40 minutos em temperatura de 25°C, 20 µL foram analisados no cromatógrafo.

## 2.8 Extração líquido-líquido em análises por CLAE-MS/MS

Para extração dos compostos, foram avaliados os solventes: água ultra pura 10% TCA, acetonitrila 2% ácido acético, acetonitrila 0,1% AF, e metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF.

Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de leite pasteurizado foram transferidas para tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> com capacidade para 1,5 mL, e submetidas à agitação (Biomixer<sup>®</sup> QL-901) por 20 segundos para homogeneização.

As amostras foram fortificadas no nível do LMR para cada composto, a partir de solução mix dos padrões na concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em água ultra pura, seguindo-se agitação por 30 segundos. As amostras foram mantidas em repouso por 20 minutos para o equilíbrio entre os antimicrobianos e a matriz. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de solvente extrator foram adicionados. Após agitação por 30 segundos, a mistura foi submetida à centrifugação a 2.200 g (Centrífuga Sigma<sup>®</sup> 1-15 PK) por 20 minutos, à temperatura de 0 °C. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram transferidas para frascos de injeção e diluídas com 500  $\mu\text{L}$  de fase móvel, procedendo-se a análise cromatográfica.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Estabilidade das soluções padrões

As soluções dos padrões em metanol, acetonitrila e acetonitrila: água ultra pura 1:1 (v/v) foram analisadas por CLAE-FL/DAD nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias, sendo as soluções mantidas às temperaturas de 8 e -12 °C.

Na análise das fluorquinolonas, para todas as condições de solvente e temperatura empregadas, os resultados do estudo de estabilidade foram semelhantes para todos os compostos da classe (norfloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino e lomefloxacino) devido às similaridades na estrutura de suas moléculas.

Para as soluções em acetonitrila: água ultra pura 1:1 (v/v), foram observadas reduções no sinal cromatográfico de todos os analitos da classe, enquanto que para soluções em metanol, o aumento de intensidade analítica foi observado para todos os compostos fluorquinolonas, demonstrando que a estabilidade de cada composto nos diferentes solventes empregados foi similar entre os antimicrobianos da classe. Considerando a forte emissão fluorimétrica das fluorquinolonas e

a alta sensibilidade do detector de fluorescência, os compostos foram analisados na concentração de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , a partir da diluição de alíquotas das soluções estoque nos solventes avaliados.

Quanto à estabilidade das fluorquinolonas à temperatura de  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , em acetonitrila: água ultra pura (1:1, v/v), as soluções padrões demonstraram uma diminuição no sinal analítico dos fármacos entre os tempos 0 e 15 dias, e o aparecimento de picos cromatográficos de estruturas de degradação, observados através de seus tempos de retenção e coeluição com os analitos, nos tempos de 30 e 45 dias. Para as soluções em acetonitrila analisadas nos tempos 0, 15 e 30 dias, os sinais analíticos das fluorquinolonas mantiveram-se estáveis, considerando que os picos cromatográficos observados não apresentaram diminuições na intensidade do sinal (altura do pico). Entretanto, foi observada diminuição da resolução dos picos, que se apresentaram mais largos no tempo de 45 dias. Os resultados estão de acordo com Cinquina et al. (2003), que relataram a estabilidade de compostos fluorquinolonas em acetonitrila por até quatro semanas, quando armazenados à temperatura de  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, os autores relataram diminuições no sinal analítico dos fármacos.

As fluorquinolonas em metanol à temperatura de  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantiveram-se estáveis até o tempo de 30 dias, apresentando maior resolução cromatográfica em comparação às soluções preparadas em mistura acetonitrila: água ultra pura e em acetonitrila. No tempo de 45 dias, uma diminuição da resolução dos picos foi observada.

Para as soluções de fluorquinolonas à temperatura de  $-12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , diminuições de sinal analítico e o aparecimento de picos cromatográficos adjacentes ou deformidades dos picos dos compostos somente foram verificados no tempo de 45 dias, mantendo sinal analítico estável nos tempos de 15 e 30 dias, quando em solução nos solventes metanol e acetonitrila: água ultra pura 1:1 (v/v).

Dessa forma, as soluções estoque de fluorquinolonas foram preparadas em metanol de modo a permitir o armazenamento à temperatura de  $-12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , com base na metodologia desenvolvida por Marazuela e Moreno-Bondi (2004), que em pesquisa com resíduos de fluorquinolonas, relataram que soluções dos padrões em metanol são estáveis por até 30 dias em temperaturas de até  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Quanto à estabilidade das sulfonamidas à temperatura de  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , nas três soluções avaliadas (metanol, acetonitrila e acetonitrila: água ultra pura 1:1, v/v), os compostos sulfapiridina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e

sulfaclorpiridazina apresentaram diminuição da intensidade do sinal analítico no tempo de 30 dias, estando de acordo com o reportado por Hoff, Barreto e Kist (2009), Zheng et al. (2008) e Huang, Yuan e Huang (2007), que em pesquisas com os mesmos resíduos, relataram a estabilidade dos compostos em solventes como metanol, acetonitrila e água, por até 30 dias quando armazenados sob temperaturas de refrigeração.

Na temperatura de  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as sulfonamidas mantiveram sinal analítico estável durante todos os períodos avaliados, demonstrando que não houve degradação dos compostos ou alterações estruturais passíveis de interferência na intensidade analítica (altura do pico) dos produtos da derivatização.

No processo de derivatização das sulfonamidas realizado no solvente aquoso (acetonitrila: água ultra pura 1:1, v/v), os picos dos compostos apresentaram as melhores resoluções analíticas, permitindo a melhor separação cromatográfica em comparação aos compostos derivatizados em metanol e acetonitrila, que demonstraram picos disformes e irregulares. Todavia, de modo a permitir o armazenamento à  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas em acetonitrila, sendo que para o desenvolvimento do método, as soluções trabalho para fortificação de amostras foram preparadas diariamente através de diluição com água ultra pura, suprimindo alterações conformacionais dos picos cromatográficos verificadas com a derivatização dos extratos orgânicos.

Os derivados fluorescentes da reação das sulfonamidas com fluorescamina mantiveram-se estáveis por até quatro horas após a reação, corroborando as observações de Hoff, Barreto e Kist (2009), que relataram diminuições significativas na intensidade fluorimétrica de sulfonamidas derivatizadas, quatro horas após a reação com fluorescamina.

Na avaliação da estabilidade do ceftiofur em soluções padrões armazenadas nas temperaturas de  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o sinal analítico do composto permaneceu estável em todos os tempos avaliados (0, 15, 30 e 45 dias), para todos os solventes empregados. A solução estoque de ceftiofur foi preparada em metanol, de modo a permitir o armazenamento à temperatura de  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os resultados encontrados estão de acordo com os relatados na literatura para compostos cefalosporinas.

Em pesquisas distintas avaliando a estabilidade do ceftiofur e outras cefalosporinas, como cefalexina e cefazolina, os autores Becker, Zittlau e Petz (2003) e Becker, Zittlau e Petz (2004) relataram a estabilidade desses compostos em água, metanol e em mistura acetonitrila: água ultra pura 1:1 (v/v), por até seis meses à temperatura de -25 °C. Neste trabalho, as soluções estoque dos analitos foram armazenadas à temperatura de -12 °C por no máximo trinta dias.

### 3.2 Determinação de íons precursores $[M+H]^+$ e otimização das transições ( $m/z$ ) em sistema ESI-MS/MS

Com as infusões das soluções intermediárias no sistema ESI-MS/MS operando no modo positivo, os íons precursores  $[M+H]^+$  foram gerados após a ionização na fonte de eletrospray, e duas transições (íons produtos) foram obtidas e selecionadas para qualificação e confirmação dos compostos. O íon produto de maior intensidade foi identificado como íon qualificador do composto, e o íon produto de menor intensidade foi determinado como íon confirmatório para identificação inequívoca dos antimicrobianos.

O monitoramento de múltiplas reações (MRM) permitiu observar as transições  $m/z$  dos íons precursores do norfloxacino, ciprofloxacino, enrofloxacino, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfaclorpiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, e sulfadimetoxina. A otimização dos parâmetros voltagem do cone e energia de colisão gerou fragmentos (transições  $m/z$ ) de maior intensidade.

As energias de colisão aplicadas variaram de 10 a 40 eV, e a voltagem do cone de 25 a 45 V. Os parâmetros otimizados para cada analito estão apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Parâmetros otimizados do monitoramento de múltiplas reações para detecção de fluorquinolonas e sulfonamidas por ESI-MS/MS, com a infusão dos compostos na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila.

	MM ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Íon qualificador ( $\text{En}^a$ , eV)	Íon de confirmação ( $\text{En}$ , eV)	Voltagem do cone (V)
NOR	319,3	$320,2^b > 302,2$ (17)	$320,0^b > 276,2$ (25)	$40^c$
CIP	331,3	$332,2 > 288,2$ (17)	$332,2 > 245,2$ (25)	40
ENR	359,3	$360,3 > 316,2$ (25)	$360,3 > 245,2$ (25)	45
STZ	255,3	$256,0 > 155,9$ (15)	$256,0 > 107,8$ (28)	30
SMR	264,3	$265,2 > 107,7$ (15)	$265,2 > 156,0$ (30)	35
SCP	284,7	$285,0 > 155,9$ (25)	$285,0 > 107,7$ (15)	30
SDX	310,3	$311,3 > 107,7$ (18)	$311,3 > 140,0$ (20)	30
SDMX	310,3	$311,0 > 155,9$ (20)	$311,0 > 107,8$ (25)	35
SMA	253,3	$254,0 > 155,9$ (15)	$254,0 > 91,6$ (25)	30

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, ENR=enrofloxacino,  
 STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclorpiridazina,  
 SDX=sulfadoxina, SDMX=sulfadimetoxina, SMA=sulfametoxazol.

<sup>a</sup> Energia de colisão em eletrovolts.

<sup>b</sup> Íon precursor  $[\text{M}+\text{H}]^+$  do analito.

<sup>c</sup> Voltagem do cone em volts.

Na determinação dos íons precursores dos analitos, os valores empregados de energia de colisão e voltagem do cone permitiram a detecção dos compostos a partir de fragmentos de maior intensidade. Na análise dos íons qualificadores e confirmatórios através do MRM, a ionização em fonte de eletrospray operando em modo positivo gerou íons precursores com maior intensidade analítica em comparação à ionização no modo negativo.

Para as fluorquinolonas, a energia de colisão e a voltagem do cone variaram de 17 a 25 eletrovolts e de 40 a 45 volts, respectivamente. Para as sulfonamidas, os fragmentos de maior intensidade foram produzidos com a voltagem do cone entre 30 e 35 volts, e energia de colisão variando de 15 a 25 eletrovolts.

Os valores determinados na otimização dos parâmetros operacionais coincidem com os relatados por Hermo et al. (2008) e Thompson e Noot (2005), que em análises por espectrometria de massas empregaram variações de voltagem do cone entre 38 e 45 V, e energia de colisão entre 12 e 22 eV, para análise de fluorquinolonas e sulfonamidas, respectivamente.

O íon precursor e os fragmentos  $m/z$  monitorados para cada analito estão de acordo com os reportados na literatura em análises de sulfonamidas e fluorquinolonas por espectrometria de massas.

Os íons qualificadores  $m/z$  dos compostos ciprofloxacino (288,2) e enrofloxacino (316,2) coincidem com os fragmentos monitorados para os mesmos compostos por Hoof et al. (2005). Para o norfloxacino, o íon de confirmação (276,2) foi monitorado na pesquisa desenvolvida por Bogialli et al. (2009). Em relação às sulfonamidas, os íons precursores determinados para sulfatiazol (256,0), sulfamerazina (265,2), sulfaclopiridazina (285,0), sulfadoxina (311,3), sulfadimetoxina (311,0) e sulfametoxazol (254,0) correspondem aos íons monitorados por Zheng et al. (2008) e Thompson e Noot (2005), em trabalhos com os mesmos compostos por CLAE-MS/MS.

Os antimicrobianos ceftiofur e danofloxacino apresentaram transições de intensidade muito baixa e insuficiente para confirmação do íon qualificador. Dessa forma, esses compostos não foram analisados em sistema ESI-MS/MS.

### **3.3 Desproteíntização de amostras e análise de interferentes por CLAE-FL/DAD**

Como o leite compreende uma matriz alimentar complexa, composta por proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, a etapa de limpeza da amostra foi realizada de modo a suprimir a interferência desses compostos através da desproteíntização da matriz.

Os solventes metanol, acetonitrila, água ultra pura e a mistura metanol: acetonitrila 1:1 (v/v), acidificados com os ácidos fórmico, fosfórico, acético e tricloroacético, permitiram a precipitação das

proteínas do leite e a separação do precipitado através de centrifugação, para todas as concentrações de ácido avaliadas (10, 20 e 30%).

Na etapa de desproteínização, a acidificação com os ácidos fórmico, fosfórico, acético e tricloroacético, em valores de pH próximos a 4,5 permitiu a formação do precipitado de proteínas insolúveis (caseínas) associadas a moléculas lipídicas retidas, passíveis de detecção por arranjo de diodos e fluorescência. As análises dos extratos de solventes acidificados com os ácidos acético, fosfórico e fórmico demonstraram a presença de picos cromatográficos característicos, com os mesmos tempos de retenção em todos os cromatogramas obtidos por CLAE-FL. Embora a precipitação proteica em pH 4,5 tenha sido efetiva para remoção de proteínas insolúveis, cerca de 20% das proteínas totais do leite são solúveis nesse valor de pH, compreendendo componentes da matriz que não ficaram retidos no precipitado proteico.

As interferências verificadas na desproteínização com os ácidos acético, fosfórico e fórmico foram provavelmente relativas a componentes do leite que não foram suprimidos na etapa de desproteínização, como as proteínas solúveis do soro e vitaminas, que são passíveis de emissão fluorimétrica (Hebert et al., 1999 e Bianchini e Penteado, 2000). Na desproteínização empregando o ácido tricloroacético, os cromatogramas obtidos não apresentaram picos de interferentes, comprovando que a utilização de TCA como agente acidificante na etapa de limpeza de amostra foi mais eficiente para remoção de interferentes da matriz, em comparação aos ácidos acético, fosfórico e fórmico.

Avaliando as concentrações de TCA (10%, 20% e 30% TCA) para precipitação proteica e remoção de interferentes da matriz, a desproteínização com os solventes avaliados (metanol, acetonitrila, água ultra pura e metanol: acetonitrila 1:1, v/v), foi eficaz para todas as concentrações de ácido tricloroacético testadas, uma vez que não foram verificados interferentes da matriz nos tempos de retenção dos compostos nos cromatogramas obtidos por CLAE-FL/DAD. Portanto, para o desenvolvimento do método, a menor concentração de ácido tricloroacético foi selecionada para precipitação proteica na matriz.

Resultados semelhantes na desproteínização do leite foram descritos por Herrera-Herrera, Hernández-Borges e Rodríguez-Delgado (2009), Mamani, Reys e Rath (2009), Rodríguez, Moreno-Bondi e Marazuela (2008), Hoof et al. (2005) e Cinquina et al. (2003), que relataram maior eficiência na remoção de interferentes empregando solventes acidificados com TCA.

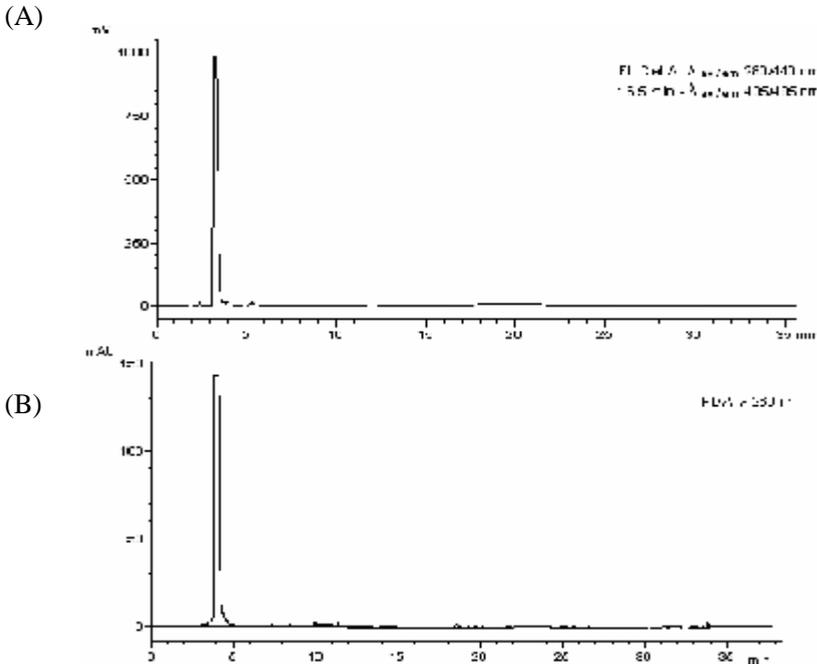
Com relação à eficiência dos agentes acidificantes em amostras fortificadas, a precipitação proteica com os ácidos acético, fosfórico e fórmico demonstraram diminuições no sinal analítico das fluorquinolonas após a extração no leite, provavelmente devido a interações entre as proteínas da matriz e os compostos, concordando com Ho et al. (2004), que descreveram que as baixas recuperações na extração de fluorquinolonas em leite podem ser atribuídas a ligações entre os antimicrobianos e as proteínas da matriz.

Entretanto, a precipitação com TCA demonstrou um aumento no sinal analítico dos compostos em relação à precipitação com os outros ácidos empregados. Os resultados coincidem com os relatados por Hermo et al. (2008) e Marazuela e Moreno-Bondi (2004), que observaram aumento significativo nas recuperações de fluorquinolonas com a extração dos compostos a partir da precipitação proteica com solvente orgânico acidificado com TCA.

A Figura 2.1 apresenta os cromatogramas do branco da matriz obtidos na etapa de desproteinização do leite com metanol 10% TCA.

Os picos observados no início dos cromatogramas, com tempo de retenção ( $T_R$ ) próximo a 5 minutos e localizados no tempo morto ( $T_M$ ) da corrida cromatográfica, são característicos de solventes da fase móvel.

Nos cromatogramas (A) e (B), observa-se a linha de base do detector sem a presença de picos cromatográficos após a análise do leite não fortificado com analitos, demonstrando que a desproteinização com solventes acidificados com ácido tricloroacético foi efetiva para remoção de interferentes da matriz. Ruídos da linha de base devido a interferências espectrais da matriz ou de reagentes não foram observados com a escala do cromatograma para análise dos compostos nas concentrações de fortificação das amostras ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ).



**Figura 2.1.** Cromatogramas do branco da matriz ( $n=20$ ). Análise de leite pasteurizado (A) por fluorescência (FL) e (B) arranjo de diodos (DAD).

Em análises por CLAE-FL, qualquer composto presente no leite que apresente fluorescência nativa pode causar interferências passíveis de visualização cromatográfica.

A vitamina riboflavina, de fluorescência nativa, foi considerada um potencial interferente da matriz. Entretanto, de acordo com Hu et al. (2007) Ruppertz et al. (2006) e Su e Lin (2003), esse composto é pesquisado em detectores fluorimétricos em comprimentos de onda de excitação na faixa de 467-474 nm, e comprimentos de onda de emissão na faixa de 515-520 nm, compreendendo faixas espectrais diferentes das empregadas no método desenvolvido.

A classe das fluorquinolonas apresentou excitação molecular no comprimento de onda de 280 nm, com espectro de emissão em 440-450 nm. Já as sulfonamidas, após reação de derivatização, apresentaram espectro de excitação e emissão moleculares, nos comprimentos de onda

de 400-405 nm e 490-495 nm, respectivamente. Assim, a detecção dos compostos permitiu a identificação e a separação cromatográfica dos antimicrobianos sem a interferência de compostos da matriz nos cromatogramas.

A identificação do antimicrobiano ceftiofur foi realizada em detector de arranjo de diodos no comprimento de onda da faixa do ultravioleta de 280 nm, em que o composto apresentou espectro de absorção máxima e maior intensidade de sinal analítico.

No comprimento de onda monitorado, possíveis interferências das proteínas solúveis do soro foram suprimidas, uma vez que as proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina são analisadas no comprimento de onda de 214 nm, segundo reportado por Almécija et al. (2007), em pesquisa com proteínas do soro empregando CLAE-UV.

### **3.4 Otimização dos parâmetros cromatográficos**

#### **3.4.1 Análises por CLAE-FL/DAD**

Na análise dos resíduos de antimicrobianos por CLAE, o pH da fase móvel influencia o carregamento dos compostos ao longo da coluna, permitindo a interação entre os analitos e a fase estacionária. Variações de pH (pH=2,5, 3,0 e 3,5) e da força do solvente (metanol e acetonitrila) permitiram a eluição dos antimicrobianos conforme suas características físico-químicas de solubilidade.

As fluorquinolonas, que apresentam maior polaridade em relação às sulfonamidas e ao ceftiofur, foram primeiramente eluídas da coluna, devido aos grupamentos carboxílicos livres na estrutura das moléculas, apresentando menor interação com a camada estacionária de fase reversa octadecil C<sub>18</sub>. Os compostos sulfonamidas, de menor polaridade em relação ao composto ceftiofur devido aos grupamentos amidas livres das moléculas, foram retidos mais fortemente à camada octadecil, apresentando os maiores tempos de retenção cromatográfica entre os analitos pesquisados.

A acidificação da fase móvel aquosa com os ácidos fórmico, fosfórico e acético, nos valores de pH 2,5, 3,0 e 3,5, permitiu a identificação e a detecção dos analitos nos cromatogramas obtidos por CLAE-FL/DAD, entretanto, a acidificação com ácido acético, permitiu a melhor separação dos compostos, em menor tempo de corrida cromatográfica, em relação aos outros ácidos utilizados. A resolução e a

intensidade (altura) dos picos cromatográficos não demonstraram alterações entre os diferentes valores de pH aplicados.

Dentre as fases orgânicas avaliadas (metanol e acetonitrila), a utilização de acetonitrila como fase móvel orgânica permitiu a eluição e detecção dos compostos em menor tempo de corrida cromatográfica, e melhor resolução (menor  $T_R/W$ ) dos picos dos compostos, em comparação à eluição com o solvente orgânico metanol.

Avaliando a separação cromatográfica dos analitos, a combinação da fase móvel composta por (A) água ultra pura 2% ácido acético, pH=3,0, e (B) acetonitrila, em modo de eluição gradiente, foi eficiente na análise das fluorquinolonas e sulfonamidas por fluorescência, e do ceftiofur por arranjo de diodos, permitindo a separação dos onze antimicrobianos pesquisados em 44 minutos de corrida cromatográfica, com sete minutos de acondicionamento da coluna.

Quanto à derivatização e análise das sulfonamidas, a composição de fase móvel empregada, em valor de pH igual a 3,0, permitiu a detecção e a separação dos compostos por fluorescência. A derivatização com 100  $\mu$ L de fluorescamina 0,1% (p/v) em acetona, realizada em alíquota de 1 mL do extrato, apresentou derivados fluorescentes estáveis por até quatro horas, apresentando boa intensidade de sinal analítico, e boa resolução dos picos cromatográficos. Os resultados estão de acordo com Posyniak, Zmudzki e Mitrowska (2005) e Stoev e Michailova (2000), que relataram que na análise de sulfonamidas derivatizadas, a faixa de pH ótimo da fase móvel é entre 2,5 e 3,5, compreendendo a faixa de pH em que os derivados da reação adquirem propriedades fluorescentes através das ligações de hidrogênio formadas.

### 3.4.2 Análises por CLAE-MS/MS

A fase aquosa (A) constituída de água ultra pura 0,1% ácido fórmico (pH=5,7) permitiu a melhor volatilização da fase móvel durante a ionização na fonte de eletrospray, gerando fragmentos com boa intensidade analítica. A acidificação da fase móvel orgânica (acetonitrila) com ácido fórmico resultou no aumento da intensidade das transições  $m/z$  dos analitos.

Resultados semelhantes foram descritos por Zhang, Ren e Bao (2009), Garcés et al. (2006) e Ito et al. (2000), que relataram aumento na volatilidade da mistura de fase móvel a partir da acidificação com ácido

fórmico, com aumento da intensidade analítica dos compostos pesquisados em sistema ESI-MS/MS.

As condições de fluxo (0,4 mL/min) e composição de fase móvel, e o gradiente de eluição empregado permitiram a separação de três compostos fluorquinolonas e seis compostos sulfonamidas, sem a utilização de tampões de fase móvel, aquecimento de coluna analítica, ou alterações de fluxo para melhor separação de analitos.

A separação dos antimicrobianos pesquisados não representou um ponto crítico na detecção dos compostos por espectrometria de massas, uma vez que os mesmos foram separados e identificados a partir de gradiente de eluição simples, com menor tempo de corrida cromatográfica, e menor tempo de recondicionamento de coluna, em relação às análises por CLAE-FL/DAD. A fase móvel orgânica (B) atingiu a concentração máxima de 98% em apenas 15 minutos de corrida, sendo suficiente para separação e detecção seletiva dos analitos através do monitoramento de múltiplas reações (MRM).

A Tabela 2.3 apresenta os gradientes de eluição otimizados para separação cromatográfica dos antimicrobianos nas análises por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS.

**Tabela 2.3.** Gradiente de eluição otimizado para separação multirresíduo de sulfonamidas, fluorquinolonas e ceftiofur extraídos do leite, nas análises por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS.

CLAE-FL/DAD		CLAE-MS/MS	
Tempo (min)	(B) MeCN (%)	Tempo (min)	(B) MeCN 0,1% AF (%)
0	10	0	2
11	21,4	15	98
14,5	40	17	98
17	45,1	20	2
23	51,1	23	2
28	51,9		
30	70		
31	100		
36	100		
37	10		
44	10		

### 3.5 Extração em fase sólida

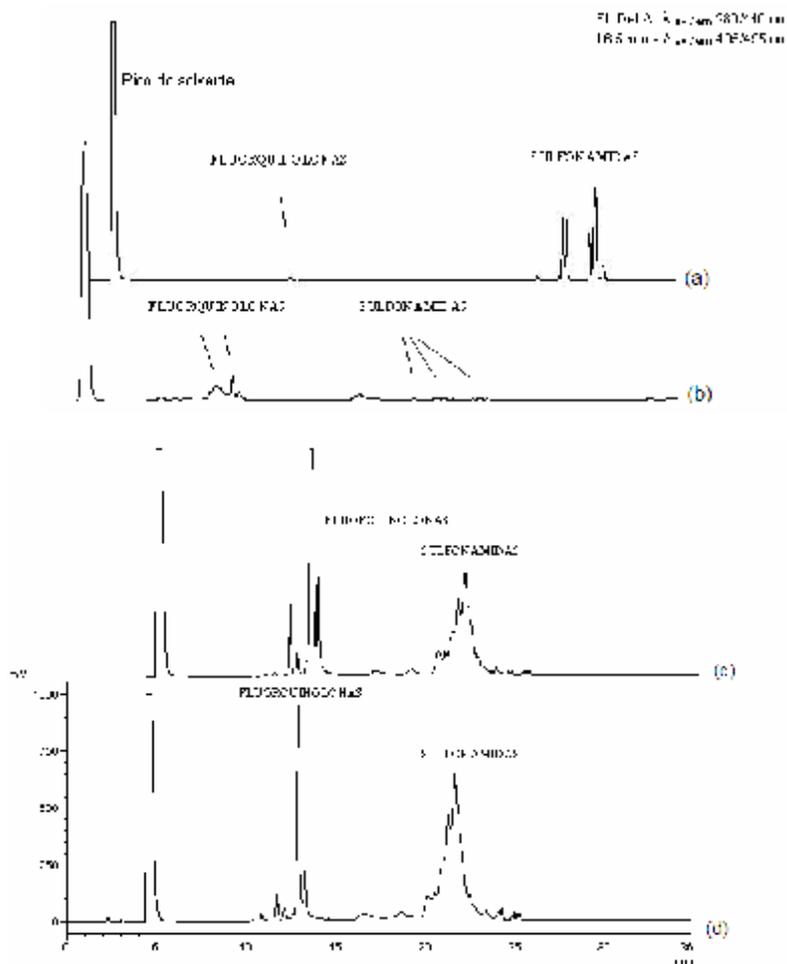
A extração em fase sólida constituiu etapas de condicionamento do material adsorvente com solventes ou mistura de solventes, seguida pela aplicação da amostra no cartucho, lavagem de impurezas e interferentes da matriz, e eluição dos analitos. A etapa de SPE foi realizada subsequentemente à desproteinização das amostras fortificadas com fluorquinolonas e sulfonamidas na concentração de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . O antimicrobiano ceftiofur não foi pesquisado durante o desenvolvimento do método de extração em fase sólida, uma vez que o procedimento foi empregado para análise em detector de fluorescência.

Em testes preliminares, a etapa de lavagem dos cartuchos foi realizada com 2 mL de água ultra pura, para retirada de interferentes do leite, como proteínas e vitaminas hidrossolúveis. Todavia, nos cromatogramas obtidos, os picos cromatográficos dos compostos não foram observados, o que pode ser explicado por perdas durante a etapa, uma vez que os compostos diluídos no extrato podem ser solubilizados no solvente de lavagem, conforme relatado por Huang, Qiu e Yuan (2009) e Karci e Balcioglu (2009). Portanto, de modo a suprimir perdas de analitos, a etapa de lavagem foi excluída do procedimento.

Para os solventes extratores empregados (MeCN 10% TCA, MeOH 10% TCA e água ultra pura 10% TCA), os melhores resultados na extração em fase sólida das sulfonamidas e fluorquinolonas foram obtidos com os extratos orgânicos acidificados, apresentando maior recuperação de analitos em comparação ao extrato aquoso.

Na análise dos compostos em adsorventes trocadores de íons, o ajuste do pH do extrato com solução de NaOH 6 N no momento da aplicação nos cartuchos, permitiu a ligação entre as moléculas de antimicrobianos e o material adsorvente. As recuperações nos adsorventes aniônico e catiônico demonstraram que em valores de pH próximos a 5,80 e 8,30 ocorre a ionização das fluorquinolonas, enquanto que em valores de pH próximos a 2,10 e 6,50 ocorre a ionização sulfonamidas, concordando com os resultados de Stubbings et al. (2005), que relataram que drogas básicas, como sulfonamidas e fluorquinolonas, podem ser concentradas por SPE a partir da ionização dos grupos funcionais de suas moléculas.

Os cromatogramas da extração em fase sólida das fluorquinolonas e sulfonamidas nos diferentes adsorventes empregados estão apresentados na Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Cromatogramas de extração em fase sólida em análises por CLAE-FL ( $n=10$ ). Fluorquinolonas e sulfonamidas em leite ( $1.000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) extraídos com acetonitrila 10% TCA. Adsorventes trocadores de íons SACE (a) e SBAE (b) com condicionamento polar (MeOH + água ultra pura) e eluição com MeOH: MeCN (1:1, v/v); (c) e (d) adsorventes octadecil  $C_{18}$ , eluição com MeOH: MeCN (1:1, v/v), com condicionamento polar (MeOH + água ultra pura) (c) e apolar (acetato de etila + acetona + ácido acético 10:10:1, v/v) (d).

Nas análises em adsorvente SBAE (amino quaternário), o pH do extrato foi ajustado para 8,0, para ionização das moléculas de fluorquinolonas em suas formas básicas, permitindo trocas iônicas e interações hidrofóbicas com o adsorvente. Entretanto, nesse valor de pH, as sulfonamidas encontram-se em estado molecular não ionizado, impedindo interações iônicas com o adsorvente.

No adsorvente trocador de cátions SACE (ácido benzeno sulfônico), o pH do extrato contendo as fluorquinolonas e sulfonamidas foi ajustado para 3,0, de modo a ocorrer a retenção seletiva por interações polares entre o resíduo sulfônico do anel aromático do adsorvente e a base aceptora de prótons do analito, conforme descrito por Lillenberg et al. (2009) e Stubbings et al. (2005). Em adsorvente C<sub>18</sub>, o pH do extrato aplicado no cartucho foi igual a 3,0, igualmente ao valor de pH da fase móvel cromatográfica inicial, que permitiu a eluição dos analitos na coluna de fase reversa.

O cromatograma (a), relativo ao adsorvente trocador de cátions (SACE), mostra que as fluorquinolonas não foram detectadas na análise do eluato após eluição no cartucho. A mistura MeOH: MeCN (1:1, v/v) não foi eficaz na eluição desses compostos, impedindo que as interações entre adsorvente e analitos fossem desfeitas. A utilização de eluente de maior força (100% MeCN) também não permitiu a detecção das fluorquinolonas por fluorescência. Entretanto, para as sulfonamidas, as condições empregadas no cartucho permitiram a eluição e detecção dos compostos nas análises por CLAE-FL. As baixas recuperações comprovam que o fator crítico na extração em fase sólida de fluorquinolonas é a forte adsorção destes compostos em adsorventes de SPE, conforme descrito por Tuerk et al. (2006), que em seu trabalho relataram que as sulfonamidas podem ser facilmente extraídas com diferentes adsorventes de extração em fase sólida, sendo mais difícil a integração de fluorquinolonas em um método multirresíduo multiclasse.

Em adsorvente trocador de ânions (SBAE) (cromatograma b), o adsorvente amino quaternário não foi eficiente para extração dos analitos uma vez que nenhum dos compostos foi identificado. As perdas de analitos foram devidas, provavelmente, à ausência de interações entre os grupamentos químicos do adsorvente e dos analitos.

Os resultados da extração em adsorvente SBAE coincidem com os obtidos por Renew e Huang (2004), que demonstraram que compostos sulfonamidas e fluorquinolonas, quando em soluções com pH próximo a 7,5, nas suas formas neutra e catiônica, respectivamente, não são retidos nesse adsorvente.

Os cromatogramas (c) e (d) demonstram melhores resultados para extração em fase sólida no cartucho de fase reversa, que apresentou maiores recuperações de analitos.

Nesse cartucho, a mistura de solventes MeOH: MeCN (1:1, v/v) permitiu a eluição dos compostos no adsorvente octadecil C<sub>18</sub>, sendo que com o condicionamento polar, maiores recuperações foram observadas para as fluorquinolonas, enquanto que com o condicionamento apolar, maiores recuperações foram observadas para as sulfonamidas. O adsorvente de fase reversa foi mais eficiente na retenção e eluição das fluorquinolonas e sulfonamidas, em comparação aos adsorventes SACE e SBAE. Entretanto, não foi possível observar a separação cromatográfica dos analitos, apesar da aplicação do mesmo gradiente de eluição definido a partir das soluções padrões em solvente.

Devido à complexidade da matriz leite, possivelmente compostos que não são retidos seletivamente no adsorvente C<sub>18</sub> foram coeluídos com os compostos e detectados por fluorescência, corroborando os relatos de Ruppertz et al. (2006) e Marazuela e Moreno-Bondi (2004), que em análises de leite por CLAE-FL, observaram que as proteínas do soro e vitaminas solúveis são passíveis de emissão fluorimétrica, causando interferências espectrais nos sinais analíticos.

De maneira semelhante, grupamentos químicos presentes na camada de sílica modificada podem ter causado interferência nas análises por CLAE, sendo que estudos recentes demonstraram a necessidade de adsorventes constituídos por misturas poliméricas, com materiais de alta e baixa polaridade, para extração em fase sólida de compostos sulfonamidas e fluorquinolonas (Herrera-Herrera, Hernández-Borges e Rodríguez-Delgado, 2009; Lillenberg et al., 2009; Kinsella et al., 2009; Bohm, Stachel e Gowik, 2009).

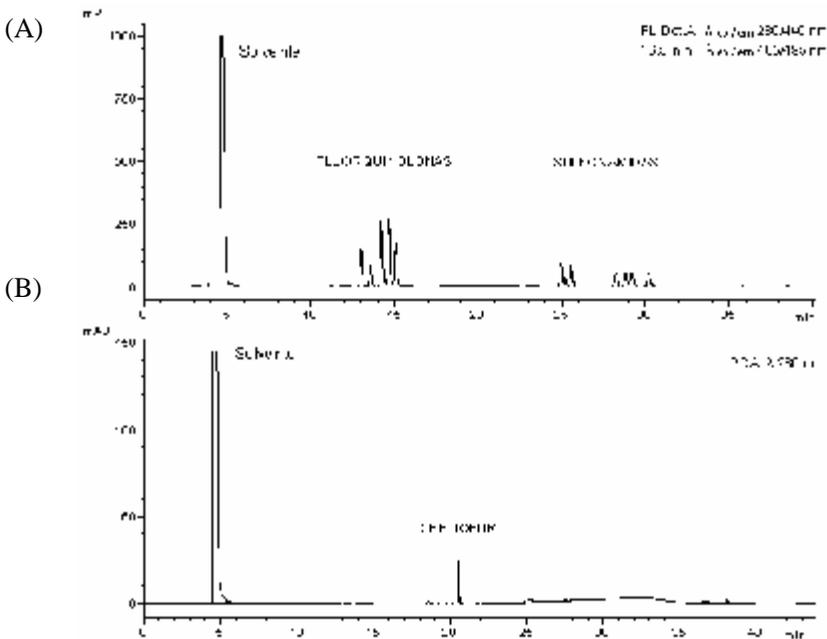
### 3.6 Extração líquido-líquido em análises por CLAE-FL/DAD

Após a fortificação com analitos, a extração com os solventes avaliados (metanol, acetonitrila, metanol: acetonitrila 1:1 (v/v), metanol 10% TCA, acetonitrila 10% TCA, e água ultra pura 10% TCA) permitiu a detecção das fluorquinolonas e sulfonamidas por fluorescência, e do ceftiofur por arranjo de diodos.

Os solventes empregados foram eficazes para a extração multiclasse de antimicrobianos em leite, sendo os picos cromatográficos dos analitos identificados e quantificados nas análises.

A Figura 2.3 apresenta os cromatogramas obtidos a partir da extração líquido-líquido com água ultra pura 10% TCA, para os resíduos na concentração de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Compostos de três classes antimicrobianas foram identificados nos cromatogramas com tempos de retenção específicos, sem superposição de picos ou coeluição de analitos, e sem a presença de interferentes da matriz. A extração com o solvente aquoso acidificado e o gradiente de eluição otimizado foram eficientes na determinação dos resíduos em leite, permitindo a análise multirresíduo em uma única corrida cromatográfica, sem a necessidade de purificação do extrato e concentração de analitos.



**Figura 2.3.** Cromatogramas da extração com água ultra pura 10% TCA de antimicrobianos em leite ( $n=20$ ). (A) Fluoroquinolonas e sulfonamidas por CLAE-FL,  $\lambda_{em}/\lambda_{exc} = 280/440 \text{ nm}$  e  $405/495 \text{ nm}$ , respectivamente. (B) Ceftiofur por CLAE-DAD,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .

Os sinais analíticos dos compostos antimicrobianos demonstraram intensidades semelhantes a partir da extração com os diferentes solventes, apresentando boas recuperações dos analitos e melhor separação cromatográfica em comparação à extração em fase sólida. Todavia, a etapa de derivatização das sulfonamidas representou ponto crítico para seleção do solvente extrator.

Na derivatização dos extratos, as melhores resoluções para os picos cromatográficos das sulfonamidas foram verificadas com a derivatização do extrato aquoso (água ultra pura 10% TCA), permitindo melhor separação dos analitos da classe em comparação à derivatização dos extratos orgânicos.

Considerando que não foi observada diferença nas recuperações dos analitos para os diferentes solventes extratores avaliados, o solvente água ultra pura 10% TCA foi selecionado como solvente extrator nas análises por CLAE-FL/DAD, apresentando menor toxicidade em relação aos solventes orgânicos metanol e acetonitrila.

Resultados semelhantes empregando a extração aquosa de resíduos antimicrobianos foram obtidos por Bogialli et al. (2008) e Bogialli et al. (2009), em análises com as matrizes alimentares leite e ovos, respectivamente. Entretanto, os autores analisaram resíduos de mesma classe antimicrobiana. Aguilera-Luiz et al. (2008) pesquisaram compostos de cinco classes antimicrobianas em leite, entretanto, nenhum composto cefalosporina foi incluído no estudo. Huang, Qiu e Yuan (2009) e Hermo et al. (2008) analisaram sulfonamidas e fluorquinolonas em leite, respectivamente, compreendendo métodos multirresíduo para análise de compostos de mesma classe antimicrobiana.

Em nosso estudo, antimicrobianos de três classes (sulfonamidas, fluorquinolonas e cefalosporinas) foram extraídos do leite e analisados por CLAE-FL/DAD, constituindo método multirresíduo multiclasse.

### 3.7 Extração líquido-líquido em análises por CLAE-MS/MS

A determinação dos íons precursores e fragmentos  $m/z$  foi suficiente para confirmação da identidade dos compostos. Os íons qualificadores das fluorquinolonas, norfloxacino, enrofloxacino e ciprofloxacino, e os íons qualificadores das sulfonamidas, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfaclorpiridazina, sulfadoxina, sulfadimetoxina e sulfametoxazol, apresentaram boa intensidade analítica (fragmentos de

alta intensidade em relação ao ruído), sendo detectados seletivamente através do MRM.

Os compostos ceftiofur (cefalosporina) e danofloxacino (fluorquinolona) não foram submetidos aos procedimentos de extração e análise por espectrometria de massas, uma vez que os íons precursores dos compostos não foram detectados no sistema ESI-MS/MS a partir das infusões das soluções padrões.

Avaliando a desproteíntização e a extração em amostras fortificadas, os diferentes solventes avaliados (água ultra pura 10% TCA, acetonitrila 2% ácido acético, acetonitrila 0,1% AF, metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF) foram eficientes quanto à precipitação proteica na matriz, verificada através dos sobrenadantes límpidos obtidos com a centrifugação à baixa temperatura (0 °C). A extração das sulfonamidas e fluorquinolonas com água ultra pura 10% TCA não permitiu a detecção dos íons precursores dos compostos no sistema ESI-MS/MS, embora os mesmos tenham sido identificados nos detectores de fluorescência e arranjo de diodos.

Com a utilização do solvente água ultra pura 10% TCA, os fragmentos (íons produto) dos analitos não foram detectados após a ionização no espectrômetro de massas, provavelmente devido ao baixo valor de pH do extrato (pH=0,9) submetido à análise. Nesse pH, a ligação de prótons às moléculas básicas das sulfonamidas e fluorquinolonas pode ter causado alterações nas moléculas dos antimicrobianos, suficientes para originar modificações nos padrões de repulsão coulombiana e ionização na fonte de eletrospray, alterando a relação massa/carga dos fragmentos provenientes da quebra das moléculas, e portanto, impedindo a detecção dos compostos através da biblioteca de dados utilizada.

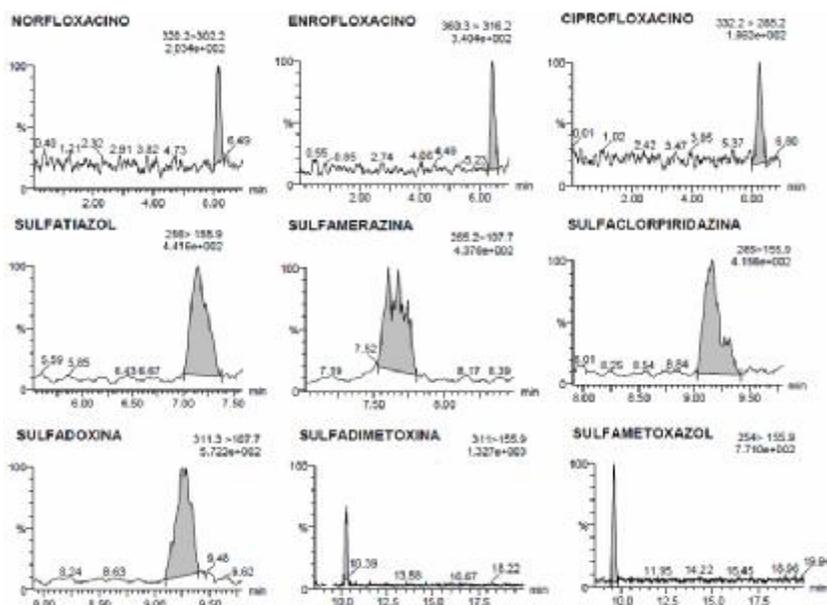
As restrições verificadas na extração com água ultra pura 10% TCA coincidem com o descrito por Diáz-Cruz e Barceló (2007), que relataram que a ruptura ou a formação de ligações químicas entre os átomos ou grupamentos de uma molécula, como a perda ou a ligação de um hidrogênio, ou uma hidrólise, altera a estrutura de um composto de forma que, uma nova ionização e quebra molecular poderá ocorrer gerando fragmentos  $m/z$  com relação massa/carga diferente da esperada para o composto em sua forma molecular pura.

Avaliando os solventes acetonitrila 2% ácido acético, acetonitrila 0,1% AF, e metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF, a mistura metanol e água foi mais eficiente na extração dos resíduos em leite, permitindo maior recuperação dos analitos, verificada através da

## Capítulo 2

intensidade dos fragmentos no detector. Os fragmentos  $m/z$  dos compostos extraídos com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF apresentaram maior intensidade analítica em comparação aos fragmentos obtidos na extração com acetonitrila 2% ácido acético e acetonitrila 0,1% AF.

A Figura 2.4 apresenta os cromatogramas por CLAE-MS/MS da extração de fluorquinolonas e sulfonamidas em leite com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF.



**Figura 2.4.** Cromatogramas das transições  $m/z$  de íons qualificadores das fluorquinolonas e sulfonamidas em leite por CLAE-MS/MS.

## 4 CONCLUSÕES

O método por CLAE-FL/DAD permitiu a análise de três classes antimicrobianas em leite, a partir de extração com água ultra pura 10% TCA. A desproteíntização do leite com o agente acidificante TCA foi eficiente na precipitação proteica e remoção de interferentes da matriz.

A extração líquido-líquido apresentou melhores resultados na análise dos resíduos em leite, sendo os picos dos compostos detectados com maior intensidade analítica e melhor resolução cromatográfica em comparação à extração em fase sólida.

A fase móvel composta por água ultra pura 2% ácido acético (pH=3,0) e acetonitrila, no modo de eluição gradiente, permitiu a separação de cinco compostos fluorquinolonas, uma cefalosporina e sete sulfonamidas, na mesma corrida cromatográfica.

Resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas foram confirmados através de espectrometria de massas em modo *tandem*, a partir da extração líquido-líquido em leite com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF, e separação cromatográfica empregando fase móvel composta por água ultra pura 0,1% AF e acetonitrila 0,1% AF.

A extração aquosa constituiu procedimento menos poluente e economicamente viável, necessitando da validação analítica para comprovação de sua aplicabilidade na análise dos resíduos em leite.

---

## **CAPÍTULO 3**

### **Validação de método multiclasse para análise de resíduos de antimicrobianos em leite**

## Validação de método multiclasse para análise de resíduos de antimicrobianos em leite

### Resumo

Métodos multiclasse permitem que compostos com diferentes propriedades físico-químicas sejam analisados em um mesmo procedimento analítico. O objetivo do trabalho foi validar método multirresíduo para análise de três classes antimicrobianas em leite por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS, de acordo com a Diretiva EC/657/2002 da Comunidade Européia. Resíduos de quatro fluorquinolonas, seis sulfonamidas e ceftiofur foram extraídos do leite com água ultra pura 10% TCA. A partir da extração com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF, os resíduos foram confirmados por espectrometria de massas. Os métodos foram aplicados na análise de 95 amostras de leite obtidas comercialmente. O método quantitativo apresentou seletividade, sensibilidade e linearidade, com coeficientes de correlação superiores a 0,98 para todas as curvas. Na exatidão, as recuperações foram superiores a 98%. Os desvios padrões relativos de precisão foram inferiores a 7,40%. Os íons precursores das sulfonamidas e fluorquinolonas foram identificados e o  $CC\beta$  qualitativo foi determinado com um intervalo de confiança de 100%. Os resultados estão em conformidade com a Legislação Européia para a validação de métodos analíticos quantitativos e confirmatórios. As amostras analisadas não apresentaram detecção para os antimicrobianos. Os métodos desenvolvidos representam alternativa eficiente para análise multiclasse de antimicrobianos em leite, com aplicabilidade comprovada através do desempenho adequado na análise de amostras reais de leite de diferentes origens.

**Palavras-chave:** Leite, antimicrobianos, validação, multiclasse, Diretiva EC/657/2002, cromatografia líquida.

## 1 INTRODUÇÃO

Agentes antimicrobianos são fármacos de ação bacteriostática ou bactericida utilizados na medicina humana e veterinária. Esses compostos podem estar presentes em alimentos como carnes, ovos, mel e leite, podendo exercer diferentes níveis de toxicidade a partir de sua ingestão (TOLDRÁ e REIG, 2006; WOODWARD, 2004).

Resíduos de antimicrobianos em leite são extensivamente pesquisados como medida de monitoramento para fins de segurança alimentar. Nos últimos anos, os principais antimicrobianos pesquisados compreendem as sulfonamidas, as fluorquinolonas e os  $\beta$ -lactâmicos (CHÁFER-PERICÁS; MAQUIEIRA; PUCHADES, 2010; DIÁZ-CRUZ e BARCELÓ, 2007).

Na análise de resíduos, a necessidade de analisar vários compostos em um mesmo procedimento, e as restrições de tempo e orçamento na prática analítica, motivaram o desenvolvimento de métodos multirresíduo (KAUFMANN, 2009).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é principalmente empregada, devido à rapidez, eficiência e precisão analítica, sendo facilmente acoplada a diferentes técnicas de detecção (ZUIDEMA et al., 2006). A espectrometria de massas como detector cromatográfico permite determinar, em termos de peso molecular, o íon precursor e seus produtos de fragmentação, gerando informações precisas e confirmatórias quanto à estrutura de uma molécula (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005).

Métodos quantitativos permitem determinar a fração de massa de um composto em valores numéricos ou unidades apropriadas, enquanto que métodos confirmatórios promovem informações complementares para identificação inequívoca de uma substância (ZUIDEMA et al., 2006).

A validação analítica significa a comprovação de que um método é adequado para sua aplicação, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos, devendo atender a critérios de desempenho de acordo com a finalidade pretendida (GOWIK, 2009).

Na validação de método quantitativo, os critérios de seletividade, faixa de trabalho e linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e robustez, devem ser atendidos (EUROPEAN UNION, 2002).

Para análise qualitativa de resíduos em alimentos de origem animal, uma porcentagem mínima de detecção de 95%, com um erro  $\beta$ , ao nível de interesse ( $CC\beta$ ), deve ser demonstrada (EUROPEAN UNION, 2002).

Componentes de matriz podem interferir na eficiência da detecção de um composto em detectores analíticos, afetando a exatidão e a reprodutibilidade do método (BECKER; ZITTLAU; PETZ, 2004). A aplicação do método através da avaliação de fatores como, diferentes tipos da matriz, condições de armazenamento, homogeneização de amostra, entre outros, é de extrema relevância na validação analítica (KAUFMANN, 2009).

O objetivo deste trabalho foi realizar a validação de método quantitativo e qualitativo para análise de resíduos de antimicrobianos fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur em leite por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS, respectivamente, em conformidade com a Diretiva EC/657/2002 da Comunidade Européia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Padrões analíticos e reagentes

Padrões dos antimicrobianos ceftiofur (CEF), enrofloxacino (ENR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), norfloxacino (NOR), e lomefloxacino (LOM) (Fluka<sup>®</sup> Steinheim, Alemanha). Sulfamerazina (SMR), sulfatiazol (STZ), sulfapiridina (SPY), sulfametoxazol (SMA), sulfaclopiridazina (SCP), sulfadimetoxina (SDMX), sulfadoxina (SDX) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> St. Louis, Estados Unidos). Reagente derivatizante fluorescamina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup> St. Louis, Estados Unidos), todos com 99% de pureza.

Os ácidos tricloroacético (TCA), fórmico (AF) e acético, de pureza analítica, e solventes acetonitrila e metanol, pureza grau HPLC (Vetec<sup>®</sup> Brasil). Para as análises cromatográficas, os solventes orgânicos foram filtrados previamente ao uso em membrana PTFE com 0,45 µm de diâmetro de poro, da marca Millipore<sup>®</sup> (Massachusetts, Estados Unidos), e água deionizada foi purificada em sistema Milli-Q Millipore<sup>®</sup> para obtenção de água ultra pura.

### 2.2 Preparo das soluções padrões

As soluções estoque dos padrões de fluorquinolonas e ceftiofur foram preparadas individualmente, na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, através da dissolução dos padrões analíticos em metanol. As soluções estoque das sulfonamidas foram preparadas individualmente na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, através de dissolução dos padrões analíticos em acetonitrila. As soluções estoques foram armazenadas à temperatura de -12 °C, por até trinta dias.

As soluções trabalho contendo os padrões CEF, ENR, CIP, NOR, SMR, STZ, SMA, SCP, SDMX e SDX, na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>, foram preparadas diariamente através da diluição combinada de alíquotas das soluções estoques em água ultra pura. Solução trabalho do padrão DAN foi preparada na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>. As soluções trabalho dos padrões internos LOM e SPY foram preparadas diariamente na concentração de 0,1 mg mL<sup>-1</sup> através de diluição de alíquotas das soluções estoque em água ultra pura.

## 2.3 Equipamentos e condições cromatográficas

### 2.3.1 Análises por CLAE-FL/DAD

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu® (Kyoto, Japão) composto por bomba de alta pressão modelo LC-20AT, desgaseificador modelo DGU-20A<sub>5</sub>, forno para coluna modelo CTO-20A e injetor manual com loop de 20 µL, controlador de sistema modelo CBM-20A, detector de fluorescência modelo RF-10A<sub>XL</sub>, detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, e software LCsolutions® versão 1.21, da Shimadzu®.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna analítica de fase reversa Shim-pack® Shimadzu C<sub>18</sub>, da série CLC-ODS(M), de dimensões 250 mm x 4,6 mm, com diâmetro de partícula interna de 5 µm, e pré-coluna analítica Shim-pack® C<sub>18</sub>, série G-ODS, de dimensões 10 mm x 4 mm. A detecção por fluorescência foi realizada monitorando os comprimentos de onda de excitação/emissão em 280/440 nm para as fluorquinolonas, e em 405/495 nm para as sulfonamidas.

Para a análise de sulfonamidas, 1 mL do extrato a ser analisado no cromatógrafo foi derivatizado com 100 µL de fluorescamina 0,1% (p/v) em acetona. O tempo da reação de derivatização foi de 40 minutos, à temperatura de 25°C. A detecção do ceftiofur foi realizada em detector de arranjo de diodos, através do monitoramento do comprimento de onda de máxima absorção do composto em 280 nm.

A separação dos analitos foi realizada no modo de eluição gradiente, sendo a fase móvel aquosa (A) composta por água ultra pura 2% ácido acético, pH = 3,0, e a fase orgânica (B) composta por acetonitrila. No tempo inicial da corrida cromatográfica, foram monitorados os comprimentos de onda de excitação/emissão em 280/440 nm, para análise das fluorquinolonas. Aos 17 minutos de corrida, os comprimentos de onda de excitação/emissão foram alterados para 405/495 nm, para a detecção das sulfonamidas.

O gradiente de eluição inicial foi constituído por 90% de A e 10% de B, sendo a concentração da fase B aumentada gradualmente para 21,4% em 11 minutos, 40,0% em 14,5 minutos, 45,1% em 17 minutos, 51,1% em 23 minutos, e 51,9% em 28 minutos. Em 30 minutos, o gradiente atingiu a concentração de 70% de B. Aos 31 minutos, o gradiente era constituído por 100% de B, sendo mantido por 5 minutos, retornando à condição inicial em 1 minuto.

A condição inicial foi mantida por 7 minutos para recondicionamento da coluna. O tempo de duração da corrida cromatográfica foi de 44 minutos, com o fluxo da fase móvel fixado em  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , e volume de injeção de amostra de  $20 \text{ }\mu\text{L}$ .

### 2.3.2 Análises por CLAE-MS/MS

As análises foram realizadas em sistema cromatográfico Waters® (Milford, Estados Unidos) composto por cromatógrafo líquido de alta eficiência Alliance HT 2795 equipado com bomba quaternária e amostrador automático com capacidade para 100 frascos de injeção, com interface para espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Quattro Micro™ API Micromass® (Manchester, Reino Unido), com fonte de ionização por eletrospray (ESI – *electrospray ionization*) e bomba de infusão. A separação dos compostos foi realizada em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Symmetry Waters®, de dimensões 75 x 4,6 mm, com diâmetro de partícula interna de  $3,5 \text{ }\mu\text{m}$ , equipada com coluna de guarda Symmetry C<sub>18</sub> (2.1 x 10 mm).

A fase móvel inicial foi composta por 98% de (A) água ultra pura 0,1% AF, e 2% de (B) acetonitrila 0,1% AF, em modo de eluição gradiente. Em 15 minutos de corrida, a composição da fase móvel foi invertida para 2% de A e 98% de B, sendo a condição mantida por dois minutos, retornando à condição inicial aos 20 minutos de corrida. O gradiente inicial foi mantido por três minutos para o recondicionamento da coluna. O fluxo da fase móvel foi de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , e o volume de injeção de amostra foi  $20 \text{ }\mu\text{L}$ .

O sistema ESI-MS/MS foi operado no modo positivo, empregando gás nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação, e gás argônio como gás de colisão. O fluxo do gás de dessolvatação foi fixado em  $400 \text{ L h}^{-1}$ , à temperatura de  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ . A temperatura da fonte de ionização foi mantida em  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , e a voltagem do capilar fixada em 3 kV.

A detecção dos compostos foi realizada através do monitoramento de múltiplas reações (MRM – *multiple reaction monitoring*), com o monitoramento de um íon precursor  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e dois produtos de transição ( $m/z$ ) para cada analito, e tempo de medida de massa (*dwel time*) de 0,1 segundos. Os dados foram processados em software Masslynx® versão 4.1, da Micromass® (Manchester, Reino Unido).

## 2.4 Amostras

Amostras de leite fluído pasteurizado, de mesma marca comercial, foram obtidas em mercado local. Para a validação analítica, as amostras foram previamente analisadas pelo método proposto de modo a comprovar a ausência dos analitos pesquisados.

## 2.5 Fortificação de amostras

As amostras foram fortificadas a partir das soluções trabalho dos antimicrobianos, em concentrações referentes aos valores de LMR para cada substância, conforme as Diretivas nº 657/2002 e nº 2377/1990 da Comunidade Européia, para construção das curvas de calibração e realização dos ensaios de validação.

## 2.6 Preparo de amostra em análises por CLAE-FL/DAD

Amostras de 1 g de leite pasteurizado foram pesadas em tubos de polipropileno e fortificadas com os analitos em concentrações na faixa do LMR estabelecido para cada antimicrobiano, a partir de solução mix dos padrões em água ultra pura. Após homogeneização (Biomixer<sup>®</sup> QL-901), as amostras foram mantidas em repouso por 20 minutos, permitindo o equilíbrio entre os compostos e a matriz.

A desproteïnização da amostra e a extração dos analitos foi realizada com a adição de 2 mL de água ultra pura 10% TCA, seguida por agitação por 30 segundos.

Os extratos foram transferidos para tubos de vidro de centrífuga, e os resíduos lavados sequencialmente com 3 vezes de 0,5 mL de água ultra pura, sendo acrescentados aos extratos. Os extratos foram submetidos à centrifugação a 1.000 g (Centrífuga Janetzki<sup>®</sup> K24) por 40 minutos, sendo os precipitados descartados e os sobrenadantes submetidos novamente à centrifugação, sob as mesmas condições.

Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes coletados em seringas de polipropileno para filtração em membranas PTFE (0,45 µm). Os filtrados foram coletados em tubos de vidro e uma alíquota de 1 mL foi retirada para derivatização das sulfonamidas com 100 µL de fluorescamina 0,1% (p/v) em acetona. Após o tempo de 40 minutos em temperatura de 25°C, 20 µL foram analisados no cromatógrafo.

## 2.7 Extração líquido-líquido em análises por CLAE-MS/MS

Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de leite pasteurizado foram transferidas para tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> com capacidade para 1,5 mL, e submetidas à agitação (Biomixer<sup>®</sup> QL-901) por 20 segundos para homogeneização da amostra. As amostras foram fortificadas com os analitos na concentração do LMR para cada antimicrobiano, a partir de solução mix dos padrões em água ultra pura, seguindo-se agitação por 30 segundos.

O equilíbrio entre os antimicrobianos e a matriz foi permitido através de repouso de 20 minutos. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF foram adicionados para a extração dos compostos. Após agitação por 20 segundos, o extrato foi submetido à centrifugação a 2.200 g (Centrífuga Sigma<sup>®</sup> 1-15 PK) por 20 minutos, à temperatura de 0 °C. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram transferidas para frascos de injeção e diluídas com 500  $\mu\text{L}$  de fase móvel inicial, procedendo-se a análise cromatográfica.

## 2.8 Validação analítica

A validação analítica do método quantitativo por CLAE-FL/DAD foi realizada de acordo com a Diretiva nº EC/657/2002 da União Européia, assumindo os critérios de desempenho: linearidade e faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e robustez.

A linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade do método foram verificadas através das curvas analíticas, determinadas a partir da análise da matriz fortificada com os analitos em concentrações na faixa do LMR definido para cada antimicrobiano, com a análise dos compostos na faixa de trabalho de 0 a 200  $\text{ng mL}^{-1}$  para STZ, SMR, SCP, SDX, SMA, SDMX, NOR, CIP, ENR, e CEF; e na faixa de trabalho de 0 a 60  $\text{ng mL}^{-1}$  para DAN, correspondente aos níveis de concentração, equidistantemente distribuídos, e relativos a 0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 vezes o LMR de cada composto.

Cada nível de concentração das curvas foi analisado a partir de seis réplicas. Os níveis foram analisados subseqüentemente e em ordem crescente de concentração, obtendo-se as áreas dos picos cromatográficos e o tempo de retenção para cada composto.

### Capítulo 3

---

A quantificação dos compostos sulfonamidas e fluorquinolonas foi realizada a partir de padronização interna, com os compostos sulfapiridina e lomefloxacino como padrões internos (PI), respectivamente. A quantificação do antimicrobiano ceftiofur foi realizada através de padronização externa com superposição de matriz.

As curvas analíticas foram construídas através do software LCsolutions® (Shimadzu), e analisadas através de Regressão Linear, sendo as inclinações das retas representativas da sensibilidade do método. O teste da razão entre sinal analítico (S) e concentração (Q) foi aplicado para verificar a linearidade dos pontos das curvas, sendo definido pela Equação 1:

$$(S/Q) \% = [(S-b) /Q] \times 100/a \quad (1)$$

Sendo:

S = sinal obtido (área ou altura do pico);

Q = concentração do analito injetada;

b = coeficiente linear;

a = coeficiente angular.

A seletividade do método foi avaliada através da comparação entre os cromatogramas da matriz isenta de analitos e os da matriz fortificada com os padrões dos antimicrobianos. Para o estudo de seletividade, vinte amostras de leite fluído, UHT e pasteurizado, de diferentes marcas comerciais, foram analisadas quanto à presença de interferentes da matriz nos tempos de retenção dos analitos.

A precisão, relativa à repetibilidade e reprodutibilidade do método, foi determinada através do desvio padrão relativo das concentrações médias globais detectadas para cada analito, em função das medições das áreas dos picos cromatográficos obtidos nas análises.

Para a repetibilidade, cada analito foi avaliado em três concentrações distintas (0,5 – 1,0 – 1,5 vezes o LMR), em matriz idêntica, com seis réplicas por nível de concentração, analisadas em um mesmo dia. O mesmo procedimento foi realizado em três dias diferentes para o estudo de reprodutibilidade. A estimativa do desvio padrão relativo foi calculado segundo a Equação 2:

$$RSD = (s / \bar{x}) \times 100 \quad (2)$$

### Capítulo 3

---

Sendo:

$s$  = estimativa do desvio padrão absoluto;

$\bar{x}$  = média de uma série de medidas.

A exatidão do método foi determinada através de ensaios de recuperação, com a fortificação da matriz em cinco níveis de concentração (0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 vezes o LMR), com seis réplicas por nível, calculando-se a recuperação média em cada nível de fortificação, segundo a Equação 3:

$$\% \text{ Recuperação} = C_1 / C_2 \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

$C_1$  = concentração medida

$C_2$  = nível de fortificação.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados através do método da relação sinal-ruído. Após o procedimento de extração de amostra, o extrato da matriz foi fortificado com os antimicrobianos em cinco níveis de concentração, entre 1 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup>, e analisado por CLAE-FL/DAD. As menores concentrações para as quais foram verificadas as relações sinal-ruído de 3:1 e 10:1, foram representativas do LD e do LQ, respectivamente.

O limite de decisão ( $CC\alpha$ ) do método foi determinado utilizando os dados dos pontos da curva de calibração matrizada, fortificados na concentração do LMR definido, e a partir do desvio padrão da reprodutibilidade. O limite de decisão do método foi calculado segundo a Equação 4:

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times \sigma \quad (4)$$

Sendo:

$\sigma$  = desvio padrão da reprodutibilidade.

A capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) do método foi determinada a partir do limite de decisão obtido, de acordo com a Equação 5:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times \sigma \quad (5)$$

Sendo:

$\sigma$  = desvio padrão da reprodutibilidade do teor médio medido no limite de decisão.

Para estudo da robustez do método, ensaios foram conduzidos através de variações de analista e de matriz. Os antimicrobianos foram fortificados nos respectivos níveis de LMR em leite e as análises foram realizadas por dois analistas, com amostras constituídas de leite pasteurizado e leite UHT do tipo semidesnatado.

Cada variação de analista foi aplicada na análise de doze amostras de matriz, compreendendo seis amostras de leite pasteurizado, e seis amostras de leite UHT semidesnatado. O teste-t de Student foi empregado na análise dos resultados, avaliados em termos de recuperação dos antimicrobianos.

## 2.9 Efeito de matriz

O efeito de matriz no sinal analítico dos compostos foi avaliado através da comparação entre a intensidade analítica dos antimicrobianos em solução padrão, e fortificados no extrato da matriz. Soluções padrões aquosas dos antimicrobianos foram preparadas na concentração do LMR para cada composto e os extratos de leite pasteurizado foram fortificados com os antimicrobianos na concentração do LMR.

O estudo foi conduzido com três amostras por grupo (matriz e solução aquosa), com três réplicas por amostra. Os resultados foram avaliados em termos de recuperação e analisados através do teste-t de Student para comparação de médias independentes.

## 2.10 Análise confirmatória por CLAE-MS/MS

A análise confirmatória dos antimicrobianos foi realizada de acordo com as recomendações da Diretiva EC/657/2002 para determinação por espectrometria de massas de resíduos com limite máximo estabelecido.

Após a extração dos analitos fortificados no nível do LMR em leite, a identificação dos íons precursores  $[M+H]^+$  e transições ( $m/z$ ) foi realizada em espectrômetro de massas com ionização das moléculas por eletrospray operando em modo positivo.

Os íons precursores dos compostos e suas transições ( $m/z$ ), provenientes da quebra molecular dos íons, foram identificados e selecionados através da biblioteca de dados do software do sistema MS/MS para confirmação através do monitoramento de múltiplas reações (MRM), a partir da análise dos extratos após injeção no cromatógrafo.

Para análise confirmatória, o valor do  $CC\beta$  qualitativo do método foi determinado com a análise de vinte amostras de leite fluído pasteurizado fortificadas com os analitos no nível de concentração referente ao limite de quantificação do método quantitativo por CLAE-FL. As amostras foram analisadas por CLAE-MS/MS para determinação do  $CC\beta$  com nível de confiança mínimo de 95%. A detecção dos analitos foi considerada a partir da relação sinal-ruído de 3:1.

A seletividade do método foi verificada através da comparação dos cromatogramas da matriz isenta de analitos, com os cromatogramas da matriz fortificada. Vinte amostras da matriz não fortificada, constituídas de leite pasteurizado e UHT, foram analisadas segundo o método qualitativo para identificação dos íons precursores e transições  $m/z$  dos compostos.

O limite de detecção do método foi determinado para cada antimicrobiano através da análise da matriz fortificada em cinco níveis de fortificação, entre 4 e 20 ng mL<sup>-1</sup>. A menor concentração do analito que apresentou relação sinal-ruído de 3:1 foi representativa do LD.

## 2.11 Aplicabilidade dos métodos quantitativo e confirmatório

O desempenho do método quantitativo por CLAE-FL/DAD foi avaliado com a análise de amostras de leite bovino, compostas por leite cru e processado industrialmente, de diferentes marcas comerciais, obtidas na cidade de Florianópolis, no Estado de Santa Catarina, Região Sul do Brasil. As amostras foram analisadas quanto à presença dos antimicrobianos pesquisados.

Na aplicação do método confirmatório, amostras de leite bovino fluído e em pó de diferentes marcas comerciais, e amostras de leite cru, foram analisadas por CLAE-MS/MS quanto à presença dos resíduos. As amostras foram coletadas na cidade de Porto Alegre, no Estado do Rio Grande do Sul, Região Sul do Brasil.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Extração e separação cromatográfica dos antimicrobianos

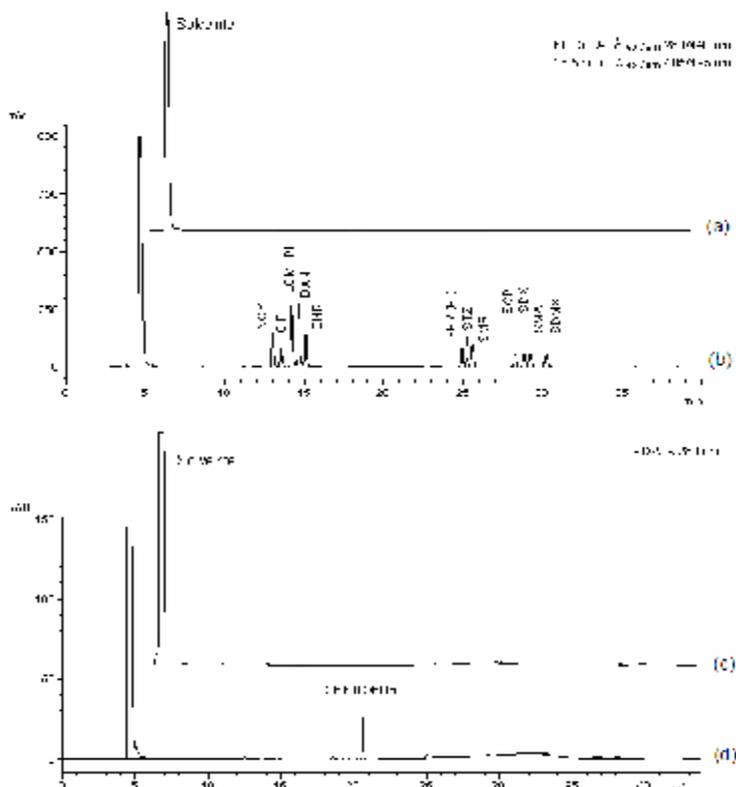
A extração com água ultra pura 10% TCA foi eficiente na análise dos resíduos em leite, com boa separação cromatográfica dos analitos, permitindo a identificação e quantificação dos compostos ceftiofur, enrofloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, norfloxacino, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfaclorpiridazina e sulfadoxina. A utilização de solvente extrator de alta polaridade permitiu a extração dos onze antimicrobianos no leite, com boas recuperações para os analitos, verificadas nos cromatogramas obtidos por fluorescência e arranjo de diodos.

Avaliando o sinal analítico, os compostos apresentaram boa intensidade analítica e boa resolução dos picos cromatográficos. A intensidade do sinal analítico demonstrou as boas recuperações obtidas para os compostos, verificadas através da escala empregada nos cromatogramas, que permitiu a supressão de ruídos da linha de base na detecção dos resíduos em nível traço.

Toda a faixa de trabalho dos antimicrobianos (0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 vezes o LMR) foi analisada a partir da extração com água ultra pura 10% TCA, apresentando detecção para todos os níveis de concentração empregados na fortificação das amostras. Os picos dos analitos foram identificados no menor nível de fortificação para todos os compostos, correspondente a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  para ciprofloxacino, norfloxacino, enrofloxacino, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfaclorpiridazina, sulfadoxina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol, e ceftiofur, e  $15 \mu\text{g kg}^{-1}$  para danofloxacino.

Na etapa de preparo de amostra, a utilização do ácido tricloroacético para acidificação do solvente extrator conferiu seletividade ao método. Os resíduos foram extraídos da amostra e separados no cromatógrafo sem coeluição de analitos ou detecção de componentes da matriz. As boas recuperações obtidas para os antimicrobianos comprovam que a etapa de desproteínezão do leite com TCA foi efetiva para limpeza de amostra e remoção de interferentes.

A Figura 3.1 apresenta os cromatogramas da extração com água ultra pura 10% TCA, na análise de leite pasteurizado fortificado com fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur, e leite pasteurizado isento de analitos, representando o branco da matriz.



**Figura 3.1.** Cromatogramas ( $n=10$ ): (a) e (b) fluorquinolonas e sulfonamidas em leite por CLAE-FL; (c) e (d) ceftiofur em leite por CLAE-DAD; (a) e (c) matriz não fortificada; (b) e (d) matriz fortificada com analitos. Níveis de fortificação: NOR, CIP, ENR, CEF, STZ, SMR, SCP, SDX, SMA, SDMX ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ); DAN ( $30 \text{ ng mL}^{-1}$ ); LOM e SPY ( $300 \text{ ng mL}^{-1}$  – padrões interno). LOM e SPY ( $300 \text{ ng mL}^{-1}$  – padrões interno). NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, LOM=lomefloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, SPY=sulfapiridina, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclopiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol, SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

O gradiente de eluição empregado permitiu a separação cromatográfica dos compostos em uma única corrida analítica, com a identificação dos mesmos com base nos tempos de retenção, e a detecção sequencial das fluorquinolonas, sulfonamidas, e do ceftiofur, constituindo método multirresíduo e multiclasse.

Com relação à derivatização das sulfonamidas, a reação com fluorescamina 0,1% (p/v) em acetona foi necessária para a detecção dos compostos por fluorescência, sendo o extrato analisado após 40 minutos da reação de derivatização, à temperatura de 25 °C.

O mesmo extrato derivatizado foi analisado a cada 60 minutos por 5 horas, apresentando diminuição de intensidade analítica dos compostos após 4 horas da reação, concordando com os resultados descritos por Hoff, Barreto e Kist (2009), que em análise de sulfonamidas por fluorescência, relataram a estabilidade dos compostos derivatizados por até quatro horas após reação com fluorescamina. Dessa forma, o tempo de duração da corrida cromatográfica (44 minutos) e o tempo da reação de derivatização fixado em 40 minutos permitiram a detecção e quantificação reprodutíveis dos compostos sulfonamidas em detector de fluorescência.

A extração aquosa empregada na análise das três classes antimicrobianas constituiu procedimento eficaz e de menor toxicidade, quando comparada à extração com solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, éter de petróleo, entre outros. Na literatura, diversos estudos afirmam que os solventes tradicionalmente empregados em procedimentos analíticos representam riscos à saúde humana e ao meio ambiente (Boscher et al., 2010; Jeong, Song e Cho, 2009). Não obstante, segundo os autores Díaz-Cruz e Barceló (2007) e Huang, Yuan e Huang (2007), a extração de resíduos farmacológicos com solventes de menor toxicidade, empregados em menores quantidades, e as técnicas automatizadas de extração, compreendem as tendências para análise de resíduos em alimentos, comprovando as vantagens do método desenvolvido neste trabalho.

A Tabela 3.1 apresenta os parâmetros da detecção cromatográfica por fluorescência e arranjo de diodos para os compostos analisados em leite.

Os comprimentos de onda da detecção por fluorescência referem-se aos comprimentos de onda de excitação e emissão espectral dos compostos, enquanto que o comprimento de onda da detecção por arranjo de diodos representa o comprimento de onda de absorção máxima para o composto ceftiofur.

**Tabela 3.1.** Parâmetros da separação multiclasse de antimicrobianos extraídos em leite em análises por CLAE-FL/DAD.

Classe antimicrobiana	Composto	T.R. <sup>a</sup> (min)	Detecção $\lambda$ (nm)
Fluorquinolonas	NOR	12,80	280 / 440
	CIP	13,33	280 / 440
	DAN	14,43	280 / 440
	ENR	14,86	280 / 440
Cefalosporinas	CEF	20,64	280
	STZ	25,50	405 / 495
Sulfonamidas	SMR	25,83	405 / 495
	SCP	28,42	405 / 495
	SDX	28,97	405 / 495
	SMA	29,34	405 / 495
	SDMX	30,40	405 / 495

<sup>a</sup> Tempo de retenção cromatográfico.

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, CEF=ceftiofur, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclorpiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol,SDMX=sulfadimetoxina.

## 3.2 Validação do método quantitativo por CLAE-FL/DAD

### 3.2.1 Seletividade

Após o procedimento de extração, a análise cromatográfica dos extratos não fortificados de leite pasteurizado e UHT, com diferentes teores de gordura, e de diferentes marcas comerciais, comprovaram a ausência de interferentes passíveis de coeluição com os analitos, uma vez que nenhuma das amostras apresentou interferentes nos tempos de retenção dos compostos analisados por CLAE-FL/DAD.

A análise do branco da matriz em amostras de leite pasteurizado é observada através dos cromatogramas (a) e (c) da Figura 3.1.

Os cromatogramas demonstram as linhas de base dos detectores sem a presença de picos cromatográficos, comprovando a seletividade do método na análise de fluorquinolonas e sulfonamidas por fluorescência, em comprimentos de onda específicos de excitação e emissão, e do ceftiofur, em comprimento de onda específico da faixa do ultravioleta, através do detector de arranjo de diodos.

Avaliando as etapas de preparo de amostra e extração na seletividade do método, o solvente empregado (água ultra pura 10% TCA) foi eficiente na remoção de componentes da matriz que poderiam causar interferências como coeluição de analitos, picos cromatográficos adicionais (interferentes), ou alterações não simétricas no formato dos picos dos compostos (por exemplo, alargamento de pico). A utilização do ácido tricloroacético para acidificação do solvente extrator permitiu a desproteíntização da matriz com precipitado proteico facilmente removido através de centrifugação e sobrenadante límpido, sendo que a análise do extrato não apresentou picos de compostos interferentes nos cromatogramas por CLAE-FL/DAD.

Os resultados da desproteíntização no leite estão de acordo com Díaz-Cruz e Barceló (2007) que relataram que etapas de limpeza de amostra e purificação de analitos podem aumentar a seletividade dos detectores em análises cromatográficas. Resultados semelhantes foram descritos por Bohm, Stachel e Gowik (2009), Mamani, Reys e Rath (2009), Rodriguez, Moreno-Bondi e Marazuela (2008) e Cinquina et al. (2003), que em análises de antimicrobianos em leite, relataram maior seletividade e maiores recuperações de analitos com a remoção de interferentes da matriz empregando solventes acidificados com TCA.

O método desenvolvido apresentou seletividade na análise de fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur em leite, em conformidade com as recomendações da Comunidade Européia (EC/657/2002), uma vez que a comparação entre os cromatogramas do branco e da matriz fortificada demonstrou a ausência de interferências espectrais e não espectrais nos picos cromatográficos dos analitos.

### **3.2.2 Faixa de trabalho, linearidade e sensibilidade**

As curvas analíticas dos onze antimicrobianos pesquisados foram determinadas de acordo com as recomendações da Diretiva EC/657/2002, sendo os dados das curvas de calibração e os resultados da análise de regressão apresentados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Análise de regressão das curvas analíticas.  $y$  = inclinação  $\times$  C + intercepto ( $y$  = área analito/área do padrão interno; C = concentração do analito).

	Inclinação	Intercepto	$r^2$	Faixa linear <sup>a</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
	(média $\pm$ D.P.; $n = 6$ )			
NOR	0,0061 $\pm$ 0,0001	0,0115 $\pm$ 0,0120	0,994	0 – 200
CIP	0,0026 $\pm$ 0,0002	0,1239 $\pm$ 0,0322	0,984	0 – 200
DAN	0,0281 $\pm$ 0,0011	0,0424 $\pm$ 0,0232	0,991	0 – 60
ENR	0,0056 $\pm$ 0,0002	0,0559 $\pm$ 0,0191	0,995	0 – 200
STZ	0,0019 $\pm$ 0,0000	0,0202 $\pm$ 0,0058	0,992	0 – 200
SMR	0,0069 $\pm$ 0,0001	0,0401 $\pm$ 0,0164	0,983	0 – 200
SCP	0,0033 $\pm$ 0,0003	0,0903 $\pm$ 0,0340	0,988	0 – 200
SDX	0,0053 $\pm$ 0,0001	0,0079 $\pm$ 0,0012	0,981	0 – 200
SMA	0,0057 $\pm$ 0,0003	0,0323 $\pm$ 0,0300	0,993	0 – 200
SDMX	0,0044 $\pm$ 0,0004	0,0209 $\pm$ 0,0068	0,988	0 – 200
CEF	0,0122 $\pm$ 0,0003	0,1798 $\pm$ 0,0040	0,992	0 – 200

<sup>a</sup> Faixa de aplicação dos compostos nas concentrações de 0 a 2 vezes o LMR em leite. NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclopiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol, SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

A Análise de Regressão Linear demonstrou bons coeficientes de correlação, com valores de  $r^2$  superiores a 0,98 para todos os compostos pesquisados, comprovando que os dados das curvas analíticas satisfazem o ajuste do modelo, na faixa de trabalho empregada. Os valores de  $r^2$  determinados no método estão de acordo com o preconizado pela Comunidade Européia, que estabelece valores iguais ou superiores a 0,90 para validação de métodos analíticos.

Em âmbito nacional, os coeficientes de correlação das curvas dos analitos satisfazem as recomendações do INMETRO, que considera adequados os coeficientes de correlação com valores superiores a 0,90.

O teste da razão entre sinal analítico e concentração (S/Q) e os coeficientes de regressão demonstraram a linearidade dos cinco pontos utilizados para construção das curvas analíticas, apresentando baixos valores de desvio padrão para o intercepto das curvas.

A faixa linear foi determinada compreendendo o intervalo entre os valores de concentração superior e inferior dos compostos analisados, atendendo ao requisito de exatidão.

Na sensibilidade, o coeficiente de regressão relativo à inclinação da reta apresentou baixos valores para o desvio padrão. Os resultados comprovam que o método apresenta sensibilidade adequada para distinguir proporcionalmente pequenas variações nas concentrações dos analitos pesquisados, estando de acordo com os preceitos determinados pela Comissão Europeia (2002).

### 3.2.3 Precisão

Na precisão, através das equações das curvas dos analitos, as concentrações foram calculadas a partir das análises cromatográficas de seis réplicas por concentração.

A Tabela 3.3 apresenta os valores de desvio padrão relativo dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade, e os valores de LMR para os antimicrobianos pesquisados em leite. Na repetibilidade, os valores do desvio padrão relativo (DPR) das concentrações calculadas para os compostos variaram de 1,01 a 7,40%, e na reprodutibilidade, variaram de 1,75 a 10,13%.

Na análise das fluorquinolonas, a precisão variou entre 1,14 e 8,90%. Para as sulfonamidas, os resultados de precisão variaram entre 1,01 e 10,13%, enquanto que para o ceftiofur a precisão do método foi determinada com valores de DPR entre 2,02 e 5,42%.

No procedimento de derivatização das sulfonamidas, variações das condições experimentais, como temperatura da solução reagente no momento da derivatização, e remoção de alíquota do extrato para reação, podem ter contribuído para os maiores valores de DPR de precisão obtidos na análise da classe, em comparação às fluorquinolonas e ceftiofur.

Nos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade, os maiores valores de DPR foram obtidos para os compostos ciprofloxacino (7,40%) e sulfaclopiridazina (10,13%), respectivamente.

**Tabela 3.3.** Valores mínimos e máximos do desvio padrão relativo dos ensaios de precisão para os compostos analisados nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR em leite.

Composto	LMR ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Repetibilidade ( $n=18$ )	Reprodutibilidade ( $n=54$ )
NOR	100	1,41 – 4,45	2,61 – 4,83
CIP	100	1,14 – 7,40	3,13 – 7,60
DAN	30	2,24 – 7,30	2,34 – 8,90
ENR	100	1,33 – 4,02	3,47 – 4,90
STZ	100	1,29 – 4,92	4,76 – 8,27
SMR	100	1,01 – 3,69	2,15 – 8,36
SCP	100	2,82 – 5,52	3,34 – 10,13
SDX	100	1,21 – 4,15	1,75 – 6,13
SMA	100	1,33 – 3,23	4,15 – 5,23
SDMX	100	1,14 – 3,05	2,46 – 7,93
CEF	100	2,02 – 4,85	4,32 – 5,42

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino,  
 ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina,  
 SCP=sulfaclorpiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol,  
 SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

A precisão do método desenvolvido foi adequada para a validação analítica em conformidade com a Diretiva EC/657/2002, que considera aceitáveis valores inferiores a 23% para o desvio padrão relativo em métodos de análise de resíduos em concentrações na ordem de 10 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Dessa forma, os resultados obtidos nos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade estão abaixo do valor máximo permitido para o desvio padrão relativo em estudos de precisão.

### 3.2.4 Exatidão

Os resultados de exatidão, avaliados em termos de recuperação na matriz fortificada, estão apresentados na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4.** Recuperação dos antimicrobianos em amostras fortificadas nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 vezes o LMR para os compostos em leite.

	Recuperação % (DPR, %)				
	1/2 LMR (n=18)	1 LMR (n=18)	3/2 LMR (n=18)	2 LMR (n=18)	Total (n=72)
NOR	97,7 (4,0)	97,5 (1,7)	104,2 (1,6)	97,5 (1,0)	99,2 <sup>a</sup> (3,3)
CIP	100,9 (7,2)	103,4 (3,7)	93,0 (3,4)	101,3 (4,1)	99,6 (4,5)
DAN	93,1 (3,1)	107,4 (8,0)	98,7 (1,2)	99,4 (3,6)	99,6 (5,8)
ENR	104,0 (4,4)	99,4 (3,4)	96,4 (4,7)	101,7 (2,2)	100,3 (3,2)
STZ	105,6 (5,0)	96,1 (7,9)	95,7 (4,6)	100,8 (2,7)	99,5 (4,6)
SMR	90,9 (3,7)	107,6 (1,2)	98,3 (8,2)	98,5 (1,7)	98,8 (6,8)
SCP	91,6 (4,1)	107,0 (4,0)	97,6 (2,5)	98,4 (6,0)	98,6 (6,3)
SDX	91,3 (3,7)	103,5 (4,5)	95,4 (1,6)	96,5 (6,9)	98,6 (5,0)
SMA	99,8 (4,9)	103,4 (5,4)	96,8 (4,0)	95,1 (8,4)	98,7 (3,6)
SDMX	91,1 (2,2)	100,3 (1,8)	97,4 (7,7)	98,1 (6,6)	98,7 (3,9)
CEF	105,7 (3,8)	95,5 (4,1)	97,1 (5,2)	100,6 (4,8)	99,7 (4,5)

<sup>a</sup> Média da recuperação global dos compostos nas concentrações: 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para NOR, CIP, EN, STZ, SMR, SCP, SDX, SMA, SDMX, e CEF; e 15, 30, 45 e 60  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para DAN. NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclopiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol, SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

Recuperações superiores a 90% foram obtidas para todos os compostos, em todos os níveis de concentração analisados (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 vezes o LMR), sendo que recuperações inferiores a 93,0% foram verificadas para os compostos sulfamerazina (90,9%), sulfaclopiridazina (91,6%), sulfadoxina (91,3%) e sulfadimetoxina (91,1%).

As análises apresentaram baixos valores de desvio padrão relativo, variando entre 1,0 e 8,4%, para os compostos norfloxacino e sulfametoxazol, respectivamente. Todos os compostos apresentaram recuperações superiores a 100% em um dos níveis de fortificação

analisados, entretanto, a média da recuperação global para os compostos não excedeu o valor de 100,3%, obtido para o enrofloxacin.

No estudo de exatidão, as maiores recuperações foram observadas para as fluorquinolonas e para o ceftiofur, que apresentaram médias de recuperação superiores a 99,2%. A média de recuperação das sulfonamidas foi inferior, variando de 98,6 a 99,5%.

Segundo a Comunidade Européia, na análise quantitativa de resíduos e contaminantes em concentrações superiores a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , recuperações na ordem de -20% a +10% são aceitáveis para validação analítica. Assim, a exatidão do método está em conformidade com a Diretiva Européia EC/657/2002, com a faixa de recuperação de analitos entre 80 a 110%, obtendo bons resultados em termos de recuperação analítica dos compostos, com recuperações superiores a 98,0% para todos os antimicrobianos pesquisados.

### 3.2.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Nas análises por CLAE-FL, os antimicrobianos fluorquinolonas, que apresentam fluorescência nativa devido à ressonância no núcleo quinolina, demonstraram elevada intensidade fluorimétrica em comparação às sulfonamidas após a reação de derivatização.

Para determinação do LD e do LQ do método nesse detector, a fortificação de fluorquinolonas no leite foi realizada em níveis de concentração inferiores às concentrações de fortificação das sulfonamidas. Entretanto, o nível máximo de fortificação empregado foi comum a ambas as classes antimicrobianas, compreendendo 20 e 50  $\text{ng mL}^{-1}$  para os limites de detecção e de quantificação, respectivamente.

Com relação à validação analítica, a Diretiva EC/657/2002 não preconiza valores para os limites de detecção e quantificação de métodos, devendo os mesmos serem obtidos experimentalmente de acordo com a técnica analítica empregada.

Na determinação do LD, os níveis de fortificação analisados para as fluorquinolonas corresponderam a 1; 2; 4; 8 e 20  $\text{ng mL}^{-1}$ . Para as sulfonamidas, os compostos foram fortificados nas concentrações de 5; 10; 14; 18 e 20  $\text{ng mL}^{-1}$ . Os mesmos níveis de fortificação empregados para as sulfonamidas mostraram-se adequados para a análise do ceftiofur, permitindo a identificação do mesmo quando analisado por CLAE-DAD.

Após o procedimento de extração no leite, os limites de detecção para as sulfonamidas e ceftiofur foram iguais a 14 e 20 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nestas concentrações, os antimicrobianos pesquisados apresentaram relação sinal-ruído superior a 3:1, representando a menor concentração em que estes compostos podem ser detectados no leite, quando analisados pelo método desenvolvido.

Os limites de quantificação foram determinados nas concentrações de 20 ng mL<sup>-1</sup> para as sulfonamidas e 32 ng mL<sup>-1</sup> para o ceftiofur, apresentando relação sinal-ruído superior a 10:1. Para as fluorquinolonas, o limite de detecção foi igual a 8 ng mL<sup>-1</sup> para os compostos enrofloxacino, norfloxacino e ciprofloxacino, e 4 ng mL<sup>-1</sup> para o danofloxacino, que apresentou maior intensidade fluorimétrica em comparação aos outros componentes da classe.

Os limites de quantificação foram determinados nas concentrações de 20 ng mL<sup>-1</sup> para o enrofloxacino, norfloxacino e ciprofloxacino, e na concentração de 10 ng mL<sup>-1</sup> para o danofloxacino, com relação sinal-ruído superior a 10:1 para os picos cromatográficos dos componentes da classe.

O limite de quantificação do método foi inferior ao limite máximo de resíduo em leite para todos os antimicrobianos. A Tabela 3.5 apresenta os limites de detecção e quantificação do método por CLAE-FL/DAD.

### 3.2.6 Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ )

O limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e a capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) compreendem parâmetros analíticos recomendados para validação de métodos segundo a Diretiva EC/657/2002 da Comunidade Européia.

Esses parâmetros foram determinados a partir dos resultados do estudo de reprodutibilidade, sendo calculados os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para cada antimicrobiano. Os valores de LMR para os compostos em leite e os parâmetros LD, LQ,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  obtidos no método são apresentados na Tabela 3.5.

De acordo com a Comissão Européia (EC/657/2002), os parâmetros  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  do método desenvolvido compreendem as concentrações nas quais, em valores superiores as mesmas, o método é capaz de distinguir e quantificar de forma confiável os compostos analisados, assumindo-se a variabilidade do método e o risco estatístico de uma análise errônea (detectado e não detectado).

**Tabela 3.5.** Parâmetros analíticos. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).

Composto	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LD	LQ	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$
CLAE-FL					
NOR	100	8	20	102,4	105,4
CIP	100	8	20	105,1	110,2
DAN	30	4	10	38,0	46,0
ENR	100	8	20	105,6	111,2
STZ	100	14	20	113,5	127,0
SMR	100	14	20	103,5	107,0
SCP	100	14	20	105,4	110,8
SDX	100	14	20	106,6	113,2
SMA	100	14	20	108,5	117,0
SDMX	100	14	20	104,6	109,2
CLAE-DAD					
CEF	100	20	32	107,0	114,0

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfa clorpiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol, SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

Segundo Hermo et al. (2008), o  $CC\alpha$  representa uma concentração crítica com um risco alfa, e o  $CC\beta$ , uma concentração crítica com um risco beta.

Para os antimicrobianos norfloxacino e sulfadoxina, por exemplo, com LMR igual a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , considerando os valores de  $CC\alpha$  calculados para esses compostos ( $102,4$  e  $106,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), o limite de decisão do método somente assume as concentrações dos compostos em leite como superiores ao LMR (amostra com detecção), com 5% de erro ( $\alpha$ ), quando a concentração medida for igual ou superior a  $102,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $106,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Dessa forma, para fins de fiscalização, uma amostra analisada pelo método, com concentração de norfloxacino igual a  $103,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ , por exemplo, apresentaria detecção acima do LMR ou não conformidade, enquanto que uma concentração igual a  $102,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  seria indicativa de não detecção acima do LMR, ou conformidade da amostra.

Para substâncias com LMR estabelecido, como os antimicrobianos, a capacidade de detecção é a menor concentração em que o método é capaz de detectar um composto, em concentração acima do limite permitido, com uma certeza estatística de  $1-\beta$ .

A exemplo do norfloxacino e da sulfadoxina, apesar da detecção (com erro  $\alpha$ ) em concentrações superiores a  $102,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $106,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ , o método somente detecta, identifica e quantifica estes compostos verdadeiramente (com certeza estatística  $1-\beta$ ) em concentrações iguais ou superiores a  $105,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $113,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Pode-se observar, portanto, que o  $CC\alpha$  é indicativo da qualificação da amostra (detecção ou não detecção) a partir do LMR do composto pesquisado, ao passo que o  $CC\beta$  compreende a característica do método em identificar, com um novo erro estatístico ( $\beta$ ) e certeza estatística ( $1-\beta$ ) uma concentração superior ao LMR de um determinado composto. Assim, a partir do  $CC\beta$  pode-se dizer, verdadeiramente, que um composto está acima do LMR, mesmo que uma não detecção seja verificada. No exemplo do norfloxacino, que apresenta detecção (conforme o  $CC\alpha$ ) na concentração de  $103,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ , somente uma concentração superior a  $105,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  representaria uma medição acima do LMR do composto.

Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  do método apresentaram valores de concentração próximos ao LMR de cada composto, para os onze antimicrobianos pesquisados em leite.

### 3.2.7 Robustez

Através do teste-t de Student, os resultados de recuperação para os analitos fortificados em leite pasteurizado e leite UHT, analisados por dois analistas, foram comparados para determinação do valor p estatístico, preditor de diferença estatística entre as medições.

As recuperações dos analitos para as variações de analista e matriz empregadas são apresentadas na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6.** Recuperações dos compostos no estudo de robustez.

	Médias das recuperações (%)				Valor p <sup>a</sup>
	(D.P., n=6)				
	Leite pasteurizado		Leite UHT semidesnatado		
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	
NOR	96,26 (0,013)	97,00 (0,020)	99,26 (0,009)	96,42 (0,004)	0,496
CIP	103,78 (0,022)	104,67 (0,013)	106,90 (0,018)	105,73 (0,020)	0,104
DAN	109,92 (0,013)	107,12 (0,022)	105,12 (0,011)	108,10 (0,009)	0,448
ENR	100,27 (0,030)	98,47 (0,016)	99,48 (0,020)	98,96 (0,018)	0,887
STZ	102,71 (0,113)	103,37 (0,067)	101,35 (0,045)	102,67 (0,123)	0,297
SMR	107,07 (0,056)	108,24 (0,021)	107,70 (0,031)	107,02 (0,020)	0,777
SCP	105,14 (0,029)	105,02 (0,017)	107,00 (0,019)	102,31 (0,023)	0,846
SDX	114,41 (0,033)	114,84 (0,021)	112,43 (0,044)	114,04 (0,037)	0,237
SMA	98,24 (0,121)	102,31 (0,108)	101,68 (0,086)	100,69 (0,120)	0,706
SDMX	102,39 (0,066)	99,82 (0,035)	98,94 (0,021)	100,51 (0,044)	0,456
CEF	95,86 (0,053)	98,36 (0,023)	96,47 (0,022)	95,22 (0,017)	0,460

<sup>a</sup> Valor de p do teste-t de Student.

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino,  
 ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina,  
 SCP=sulfaclorpiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol,  
 SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

As análises dos leites pasteurizado e UHT fortificados na concentração do LMR dos antimicrobianos, igual a 100 µg L<sup>-1</sup>, com exceção do danofloxacino com LMR igual a 30 µg L<sup>-1</sup>, demonstraram recuperações superiores a 95% para todos os compostos nas amostras analisadas por dois analistas.

### Capítulo 3

O teste-t de Student determinou valores de p maiores do que 0,05 para todos os compostos, demonstrando que não houve diferença significativa nos resultados obtidos com variações de analista e matriz. Além disso, as médias de recuperações não diferiram em mais de 5% entre os dois analistas e entre os dois tipos de leite analisados, estando de acordo com as recomendações da Comunidade Européia e do INMETRO, que para validação analítica, assumem a robustez do método quando os resultados encontrados com as variações empregadas não diferem em  $\pm 5\%$ .

Dessa forma, o método mostrou-se robusto em análises de leite pasteurizado e UHT semidesnatado, realizadas por dois analistas.

### 3.3 Efeito de matriz

Os valores de p do teste e as médias das recuperações obtidas nas análises por CLAE-FL/DAD são apresentados na Tabela 3.7.

**Tabela 3.7.** Recuperação dos antimicrobianos no estudo do efeito de matriz.

Composto	Médias das recuperações % (D.P., n=9)		Valor de p <sup>a</sup>
	Solução aquosa	Extrato da matriz	
NOR	96,83 (0,001)	95,60 (0,022)	0,098
CIP	103,03 (0,009)	103,26 (0,014)	0,998
DAN	109,69 (0,004)	107,97 (0,029)	0,367
ENR	105,43 (0,008)	102,97 (0,002)	0,181
STZ	94,14 (0,032)	91,70 (0,024)	0,112
SMR	104,90 (0,033)	100,84 (0,020)	0,073
SCP	101,98 (0,087)	98,80 (0,149)	0,074
SDX	112,59 (0,014)	105,53 (0,087)	0,061
SMA	104,43 (0,048)	100,98 (0,019)	0,098
SDMX	99,62 (0,064)	97,25 (0,123)	0,128
CEF	96,59 (0,025)	92,79 (0,017)	0,071

<sup>a</sup> Valor de p do teste-t de Student.

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, DAN=danofloxacino, ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclopiridazina, SDX=sulfadoxina, SMA=sulfametoxazol, SDMX=sulfadimetoxina, CEF=ceftiofur.

Os resultados do teste-t de Student demonstraram que os sinais cromatográficos dos compostos não apresentaram diferença significativa nas análises do extrato e da solução aquosa, verificada através das recuperações dos analitos.

As recuperações dos analitos nas análises da solução aquosa e do extrato da matriz foram superiores a 91% para todos os analitos pesquisados. Os valores de p obtidos no teste-t de Student para comparação das médias de recuperação foram maiores do que 0,05, comprovando que não há diferença significativa entre as médias obtidas.

Considerando que supressões de sinal analítico (Bernal et al., 2009) ou aumento de intensidade analítica de compostos (Becker; Zittlau e Petz, 2004) podem ser observados devido a interferências de matrizes alimentares, os resultados obtidos comprovaram que na análise dos resíduos em leite, o efeito de matriz não foi significativo na detecção dos compostos.

No método desenvolvido, o efeito de matriz foi compensado com a utilização de padronização interna para quantificação dos resíduos sulfonamidas e fluorquinolonas, realizada de acordo com a relação entre os sinais analíticos do composto e do padrão interno. Os padrões internos lomefloxacino e sulfapiridina foram adicionados na mesma concentração para todos os pontos da curva analítica, sendo igualmente susceptíveis às variações experimentais e perdas durante o procedimento de análise no leite.

Na análise do ceftiofur, o estudo do efeito de matriz foi especialmente importante, devido à ausência de um padrão interno da mesma classe antimicrobiana, com propriedades físico-químicas semelhantes. Todavia, os resultados demonstraram que o sinal cromatográfico do composto não sofreu alterações significativas, como supressão ou aumento de intensidade analítica (valor de  $p > 0,05$ ), comprovando que a quantificação realizada por padronização externa com superposição de matriz foi adequada para quantificação deste antimicrobiano.

### **3.4 Método confirmatório por CLAE-MS/MS**

A análise confirmatória dos resíduos foi realizada de acordo com a Diretiva EC/657/2002 da Comunidade Européia, que prevê a confirmação analítica de substâncias do grupo B, referente a medicamentos veterinários de uso lícito, nos casos de detecção acima do

limite máximo permitido. Embora a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por fluorescência seja considerada adequada como método confirmatório para análise de substâncias do grupo B, como os agentes antimicrobianos pesquisados, a confirmação por espectrometria de massas permitiu a identificação inequívoca dos compostos, gerando informações complementares quanto à estrutura molecular dos mesmos.

O método qualitativo desenvolvido por CLAE-MS/MS compreendeu a análise confirmatória dos analitos em leite em conformidade com a Diretiva, que estabelece que a detecção espectrométrica somente compreende método confirmatório quando acoplada à técnica de separação cromatográfica.

### 3.4.1 Análise qualitativa dos íons precursores $[M+H]^+$ e transições ( $m/z$ )

Após a extração no leite e análise cromatográfica, as moléculas dos antimicrobianos foram identificadas no sistema ESI-MS/MS, através do monitoramento de múltiplas reações (MRM), com a detecção de um íon precursor e duas transições  $m/z$  para os compostos ciprofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfaclorpiridazina, sulfadoxina, sulfametoxazol, e sulfadimetoxina.

O sistema de pontos atribuiu um ponto para cada íon precursor analisado, e 1,5 pontos para cada transição  $m/z$  (íon produto) monitorada, totalizando quatro pontos no sistema de identificação para cada antimicrobiano.

A confirmação da identidade dos analitos atendeu às exigências da Comunidade Européia, que determina que para o modo de detecção MRM em análises de substâncias compreendidas no grupo B, um total de três pontos deve ser obtido em análises confirmatórias.

No sistema ESI-MS/MS, as infusões dos compostos danofloxacino e ceftiofur, efetuadas com a injeção dos padrões em acetonitrila, na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , demonstraram baixa intensidade de fragmentos resultantes da ionização, não permitindo a análise confirmatória desses resíduos.

Os parâmetros da análise confirmatória dos compostos estão apresentados na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8.** Análise confirmatória dos antimicrobianos em leite por CLAE-ESI/MS/MS, a partir da extração com metanol: água ultra pura 70:30 (v/v) 0,1% AF.

Analito	M.M. (g mol <sup>-1</sup> )	T.R. <sup>a</sup> (min)	Íon precursor [M+H] <sup>+</sup>	Íon qualificador <i>m/z</i> (EC) <sup>b</sup>	Íon de confirmação <i>m/z</i> (EC) <sup>b</sup>
NOR	319,3	6,04	320,2	302,2 (17)	276,2 (25)
CIP	331,3	6,14	332,2	288,2 (17)	245,2 (25)
ENR	359,3	6,34	360,3	316,2 (25)	245,2 (25)
STZ	255,3	7,08	256,0	155,9 (15)	107,8 (28)
SMR	264,3	7,52	265,2	107,7 (15)	156,0 (30)
SCP	284,7	9,09	285,0	155,9 (25)	107,7 (15)
SDX	310,3	9,14	311,3	107,7 (18)	140,0 (20)
SDMX	310,3	9,15	311,0	155,9 (20)	107,8 (25)
SMA	253,3	9,49	254,0	155,9 (15)	91,6 (25)

<sup>a</sup> Tempo de retenção cromatográfico.

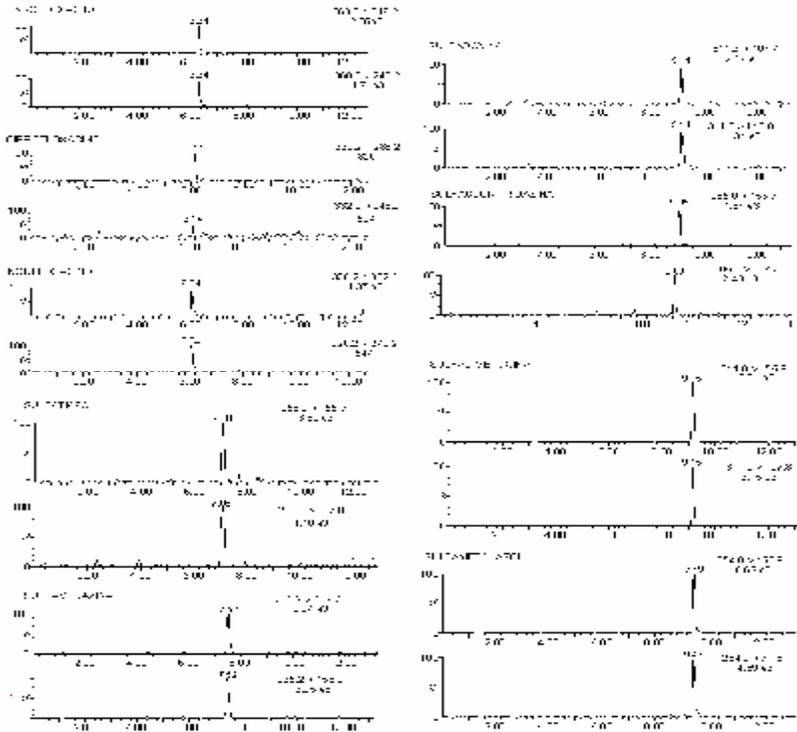
<sup>b</sup> Energia de colisão em eletrovolts.

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfacolorpiridazina, SDX=sulfadoxina,SDMX=sulfadimetoxina, SMA=sulfametoxazol.

Com a ionização por eletrospray operando em modo positivo, os íons precursores [M+H]<sup>+</sup> gerados para os compostos foram selecionados para fragmentação no triplo quadrupolo, permitindo a visualização dos picos dos analitos nos cromatogramas obtidos por CLAE-MS/MS. Para confirmação da identidade dos antimicrobianos, duas transições *m/z* foram monitoradas, compreendendo um íon qualificador, que apresentou maior intensidade, e um íon confirmatório, que apresentou menor intensidade.

Alguns compostos apresentam a mesma massa molar, como sulfadoxina e sulfadimetoxina (310,3 g mol<sup>-1</sup>); ou fragmentos com a mesma relação massa/carga, como ciprofloxacino e enrofloxacino (íon de confirmação - 245,2), e sulfadimetoxina e sulfametoxazol (íon qualificador - 155,9). Entretanto, a confirmação dos compostos a partir do monitorando de dois fragmentos provenientes do íon precursor da molécula permitiu a detecção inequívoca dos antimicrobianos. A seletividade do método com detecção por MS/MS permitiu a análise dos resíduos em menos de dez minutos de corrida cromatográfica.

A Figura 3.2 apresenta os cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações para os analitos extraídos em leite, demonstrando boa intensidade para os íons qualificadores e confirmatórios, respectivamente.



**Figura 3.2.** Cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações. Transições  $m/z$  dos compostos sulfonamidas e fluorquinolonas em leite.

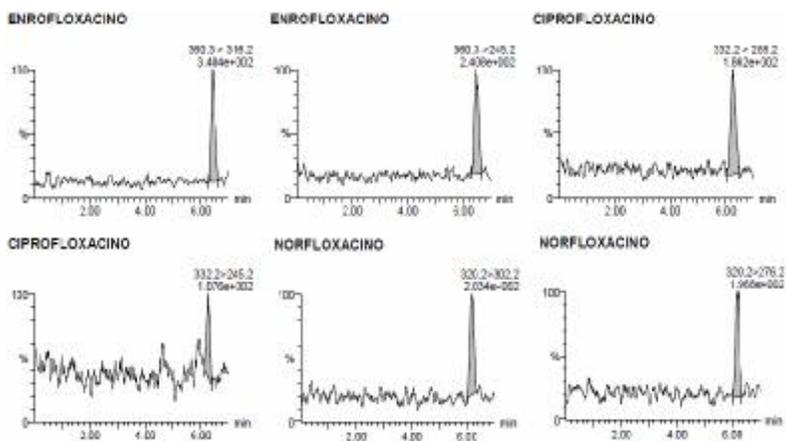
### 3.4.2 Determinação do $CC\beta$ qualitativo

Uma vez que o método por CLAE-MS/MS compreende a análise confirmatória para determinação dos analitos pesquisados no leite, o  $CC\beta$  foi determinado no nível de concentração do limite de quantificação do método validado por CLAE-FL, permitindo que um resíduo quantificado por fluorescência seja confirmado através da

espectrometria de massas. As análises do leite pasteurizado fortificado na concentração de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  permitiram a identificação dos fragmentos dos compostos com relação sinal-ruído superior a 3:1 em todas as amostras analisadas, representando 100% de detecção ao nível do LD do método quantitativo por CLAE-FL.

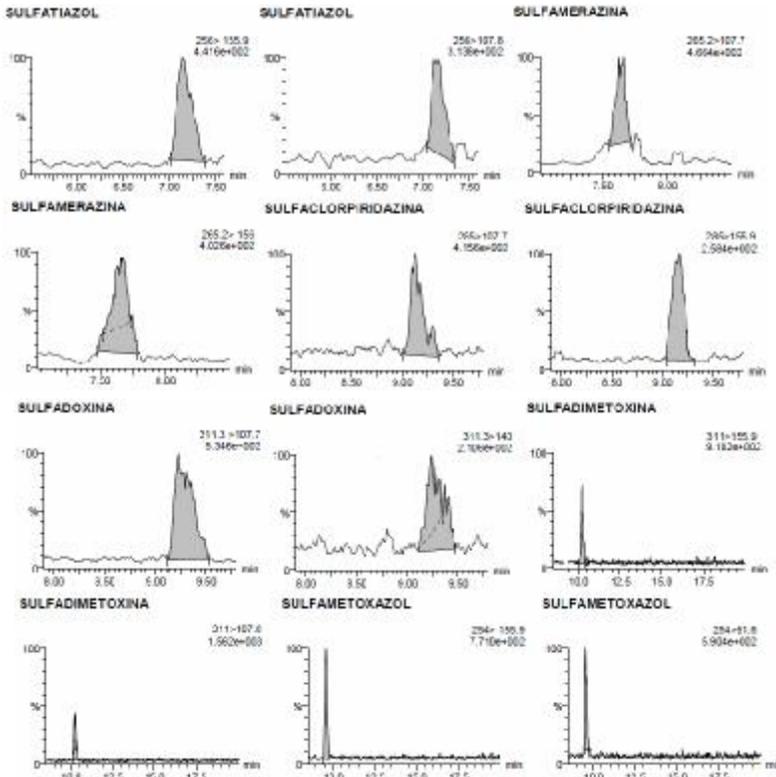
Os cromatogramas das transições  $m/z$  das fluorquinolonas e sulfonamidas, em uma das amostras analisadas por CLAE-MS/MS, estão apresentados nas Figuras 3.3 e 3.4, respectivamente.

Os picos cromatográficos sombreados mostram a integração do software a partir da detecção dos íons selecionados na biblioteca de dados, relativos aos fragmentos das moléculas dos antimicrobianos. Os íons qualificadores e confirmatórios demonstraram boa intensidade analítica para todos os resíduos pesquisados no leite.



**Figura 3.3.** Cromatogramas dos íons qualificadores e confirmatórios das fluorquinolonas, respectivamente. Amostra de leite pasteurizado fortificada com os compostos na concentração de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Cromatogramas semelhantes foram obtidos para as vinte amostras analisadas por CLAE-MS/MS, com detecção dos íons produto para todos os resíduos antimicrobianos nas amostras fortificadas. O valor do  $CC\beta$  para os resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas na análise qualitativa foi igual a  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ , com intervalo de confiança de 100%, comprovando que o método é adequado para análise confirmatória dos resíduos de acordo com a Diretiva EC/657/2002.



**Figura 3.4.** Cromatogramas dos íons qualificador e confirmatório das sulfonamidas, respectivamente. Amostra de leite pasteurizado fortificada com os compostos na concentração de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ .

### 3.4.3 Seletividade

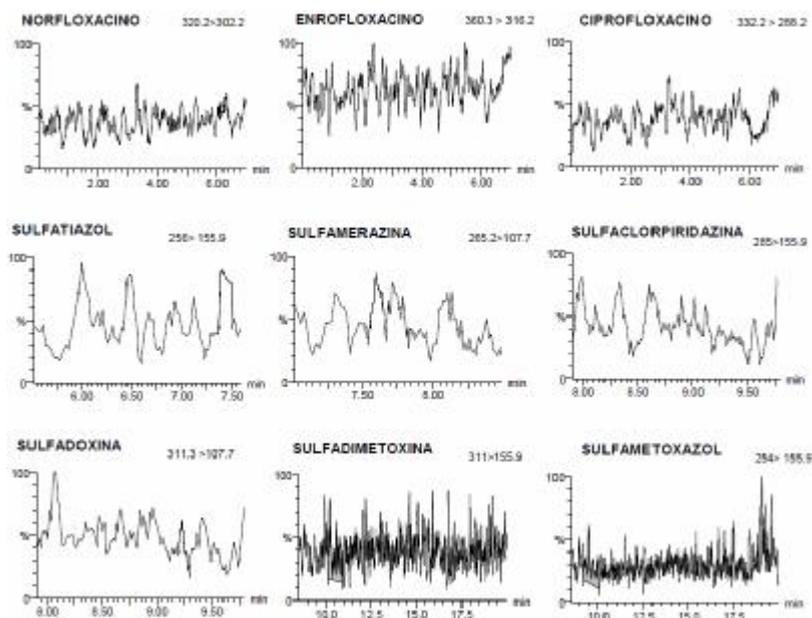
As análises das diferentes amostras da matriz não fortificada comprovaram a seletividade do método, uma vez que os cromatogramas do MRM não apresentaram detecção de analitos, ou de interferentes da matriz.

A comparação entre os cromatogramas das amostras fortificadas (Figuras 3.3 e 3.4) e os cromatogramas obtidos nas análises do branco da matriz, demonstrou que nenhum íon precursor ou íon produto dos

### Capítulo 3

antimicrobianos foi detectado nas amostras de leite pasteurizado e UHT analisadas por CLAE-MS/MS.

A Figura 3.5 apresenta os cromatogramas do MRM obtidos para uma das amostras de leite analisadas, demonstrando a matriz isenta de analitos.



**Figura 3.5.** Cromatogramas dos íons qualificadores das fluorquinolonas e sulfonamidas em amostra de leite UHT semidesnatado não fortificada.

Nos cromatogramas observados para a amostra de leite UHT semidesnatado, nenhum dos íons qualificadores dos antimicrobianos pesquisados foi detectado nas análises, não havendo integração de picos pelo software. Cromatogramas similares foram obtidos para todas as amostras de leite analisadas, comprovando a seletividade das análises por CLAE-MS/MS.

Em amostras fortificadas, a técnica de espectrometria de massas permitiu a identificação seletiva dos compostos através de suas transições  $m/z$  (íons produto), após a fragmentação dos íons precursores.

A utilização do sistema MS/MS operando através do monitoramento de múltiplas reações constituiu um modo de varredura

bastante seletivo, no qual o instrumento foi otimizado para que no primeiro quadrupolo somente o íon precursor de interesse fosse selecionado e transmitido à cela de colisão, onde os fragmentos gerados foram selecionados no terceiro quadrupolo, e detectados seletivamente pelo software.

A exemplo da sulfamerazina, o primeiro quadrupolo foi otimizado em modo positivo, de modo a selecionar somente o composto de relação massa/carga 265,2  $[M+H]^+$  (Tabela 3.8 do item 3.5.1). Após a fragmentação na cela de colisão, somente os fragmentos de maior abundância, 107,7 e 156,0  $m/z$  (íons produto), foram selecionados no terceiro quadrupolo para atingir o detector. Todos estes procedimentos combinados conferiram alta seletividade ao método.

#### 3.4.4 Limite de detecção (LD)

A menor concentração dos antimicrobianos que apresentou relação sinal-ruído de 3:1 foi representativa do limite de detecção do método qualitativo. Os compostos sulfonamidas e fluorquinolonas foram fortificados em leite pasteurizado nas concentrações de 4  $ng\ mL^{-1}$ , 5  $ng\ mL^{-1}$ , 7,5  $ng\ mL^{-1}$ , 10  $ng\ mL^{-1}$ , e 12  $ng\ mL^{-1}$  e analisados por CLAE-MS/MS.

A Tabela 3.9 apresenta os limites de detecção e o valor de  $CC\beta$  obtidos para as sulfonamidas e fluorquinolonas pesquisadas em leite.

Os antimicrobianos enrofloxacino e sulfadoxina apresentaram os menores limites de detecção ( $LD=5\ ng\ mL^{-1}$ ), demonstrando maior sensibilidade do método na análise desses compostos, provavelmente devido à melhor ionização de suas moléculas na fonte de eletrospray, em comparação aos outros compostos analisados.

**Tabela 3.9.** Limite de detecção e  $CC\beta$  do método confirmatório por CLAE-MS/MS.

Composto	Valor de $CC\beta$ qualitativo (ng mL <sup>-1</sup> )	
	LD do método	
NOR	20	10
CIP	20	10
ENR	20	5
STZ	20	10
SMR	20	10
SCP	20	20
SDX	20	5
SDMX	20	20
SMA	20	20

NOR=norfloxacino, CIP=ciprofloxacino, ENR=enrofloxacino, STZ=sulfatiazol, SMR=sulfamerazina, SCP=sulfaclorpiridazina, SDX=sulfadoxina,SDMX=sulfadimetoxina, SMA=sulfametoxazol.

Entre as sulfonamidas, o sulfatiazol e a sulfamerazina apresentaram os menores limites de detecção, determinados em 10 ng mL<sup>-1</sup>, igualmente aos compostos fluorquinolonas norfloxacino e ciprofloxacino.

Os analitos sulfaclorpiridazina, sulfadimetoxina e sulfametoxazol não foram detectados nas concentrações avaliadas (4; 5; 7,5; 10 e 12 ng mL<sup>-1</sup>), apresentando baixa intensidade analítica dos fragmentos, não sendo obtida a relação sinal-ruído de 3:1. Portanto, o limite de detecção para esses compostos foi determinado na concentração de 20 ng mL<sup>-1</sup>, conforme o  $CC\beta$  do método qualitativo.

### 3.5 Desempenho dos métodos quantitativo e confirmatório

As amostras analisadas por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS não apresentaram detecção para os compostos, considerando os limites de detecção das técnicas para as fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur.

A Tabela 3.10 apresenta os resultados das análises na aplicação dos métodos quantitativo e confirmatório em amostras reais de leite coletadas nos municípios de Florianópolis e Porto Alegre, da Região Sul do Brasil.

**Tabela 3.10.** Aplicação dos métodos quantitativo e confirmatório na análise de resíduos de sulfonamidas, fluorquinolonas e ceftiofur em amostras de leite dos municípios de Florianópolis e Porto Alegre.

Amostras	CLAE-FL/DAD ( <i>n</i> =45) <sup>a</sup>		CLAE-MS/MS ( <i>n</i> =50) <sup>b</sup>	
	Total analisado	Total com detecção (%)	Total analisado	Total com detecção (%)
<b>Leite fluído</b>				
Tipo Cru	2	0	2	0
Tipo Pasteurizado	3	0	2	0
Tipo UHT integral	16	0	24	0
Tipo UHT semidesnatado	11	0	9	0
Tipo UHT desnatado	8	0	8	0
<b>Leite em pó</b>				
Tipo integral	3	0	4	0
Tipo desnatado	2	0	1	0

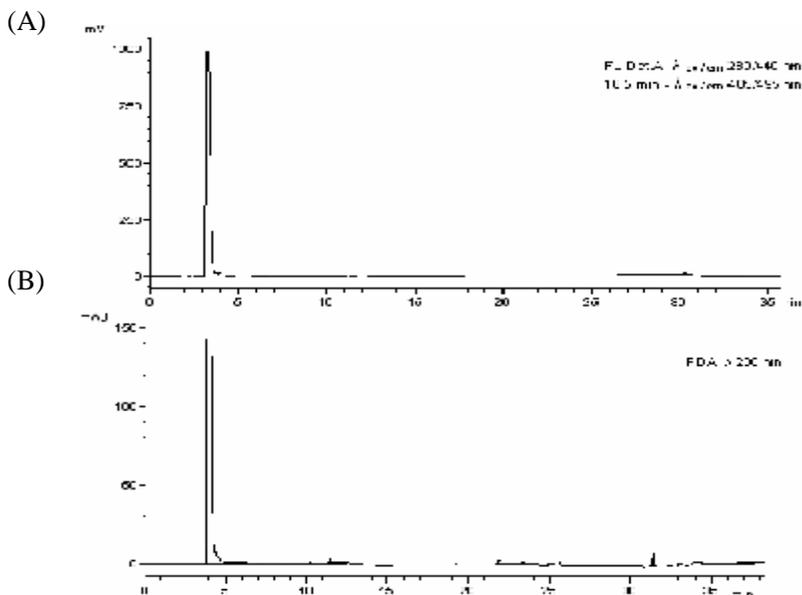
<sup>a</sup> Amostras coletadas no Município de Florianópolis – Santa Catarina.

<sup>b</sup> Amostras coletadas no Município de Porto Alegre – Rio Grande do Sul.

Nas análises por CLAE-FL/DAD, nenhuma das amostras apresentou resíduos dos antimicrobianos fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur. A Figura 3.6 apresenta os cromatogramas para amostra de leite UHT integral, a partir da extração com água ultra pura 10% TCA.

Os cromatogramas não apresentaram picos cromatográficos nos tempos de retenção dos analitos, representando a não detecção dos compostos na amostra. Cromatogramas semelhantes foram obtidos para todas as amostras de leite analisadas pelo método validado por CLAE-FL/DAD (*n*=45), considerando-se os limites de detecção para análise dos compostos nos detectores de fluorescência e arranjo de diodos.

O desempenho do método validado foi avaliado com a análise de 45 amostras de leite, compreendendo aplicação mais abrangente em comparação às descritas por Herrera-Herrera, Hernández-Borges e Rodríguez-Delgado (2009) e Huang, Qiu e Yuan (2009) em metodologias validadas para análise de antimicrobianos em leite. Os autores analisaram, respectivamente, 24 amostras de leite por CLAE-FL e 3 amostras de leite por CLAE-DAD.



**Figura 3.6.** Cromatogramas da análise de leite tipo UHT integral. (A) detector de fluorescência e (B) detector de arranjo de diodos.

Considerando que a avaliação do desempenho do método é de fundamental importância na validação analítica (Gowik, 2009), a aplicabilidade do método por CLAE-FL/DAD foi adequada para análise de resíduos de ceftiofur, sulfonamidas e fluorquinolonas em leite.

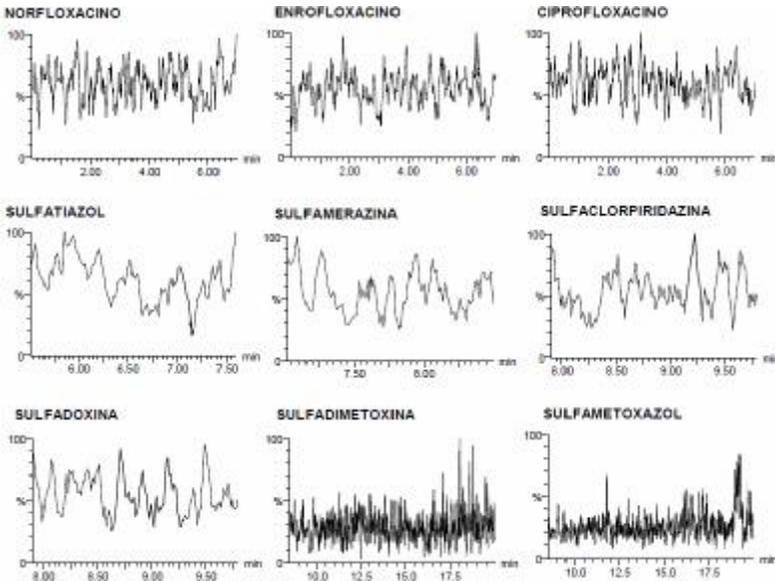
Na aplicação do método confirmatório, as amostras analisadas não apresentaram detecção para os resíduos, considerando-se o limite de detecção da técnica.

As Figuras 3.7 e 3.8 apresentam, respectivamente, os cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações para análise de fluorquinolonas e sulfonamidas em amostras de leite em pó e leite UHT integral por CLAE-MS/MS.

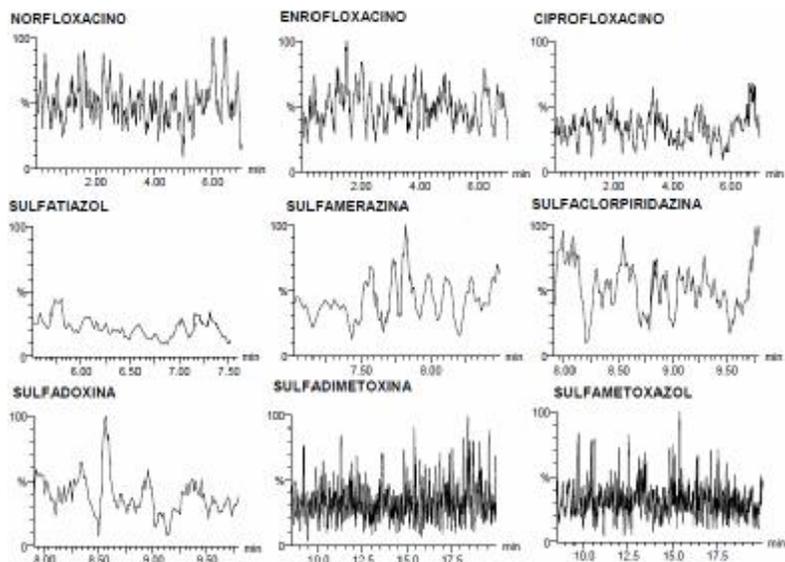
Nos cromatogramas observa-se que os fragmentos dos compostos não foram detectados no monitoramento seletivo através do MRM, uma vez que não foi verificada a integração de picos pelo software, sendo as amostras de leite UHT e leite em pó consideradas isentas dos resíduos.

Cromatogramas similares foram obtidos para todas as amostras analisadas por espectrometria de massas, com a ausência dos fragmentos monitorados, determinando a não detecção dos antimicrobianos.

Os métodos desenvolvidos por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS permitiram a análise de resíduos de sulfonamidas, fluorquinolonas e ceftiofur em diferentes tipos de leite (fluido e em pó), de diferentes processamentos e marcas comerciais, comprovando adequado desempenho analítico e aplicabilidade nas análises quantitativa e qualitativa confirmatória dos antimicrobianos em leite.



**Figura 3.7.** Cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações para análise de fluorquinolonas e sulfonamidas em amostra de leite UHT integral analisada por CLAE-MS/MS.



**Figura 3.8.** Cromatogramas do monitoramento de múltiplas reações para análise de fluorquinolonas e sulfonamidas em amostra de leite em pó integral analisada por CLAE-MS/MS.

#### 4 CONCLUSÕES

O método analítico multirresíduo por CLAE-FL/DAD para análise de compostos de três classes antimicrobianas em leite foi validado de acordo com a Diretiva nº 657 de 2002 da Comunidade Européia.

O método validado demonstrou resultados adequados nos critérios de desempenho, como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) e robustez, atendendo às exigências estabelecidas pela Comunidade Européia, com relação à análise de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal.

A análise por espectrometria de massas em modo *tandem* permitiu a confirmação dos resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas em leite, em conformidade com a Diretiva EC/657/2002.

A aplicabilidade dos métodos quantitativo e qualitativo confirmatório foi comprovada com a análise de 95 amostras de leite fluído e em pó, cru e processado, de diferentes marcas comerciais. As amostras analisadas não apresentaram resíduos dos antimicrobianos pesquisados, considerando os limites de detecção dos métodos por CLAE-FL/DAD e CLAE-MS/MS.

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os riscos à saúde humana e os prejuízos na cadeia agropecuária leiteira devido à presença de resíduos de antimicrobianos em leite, este trabalho apresentou o desenvolvimento e a validação de método analítico multirresíduo multiclasse para análise de antimicrobianos fluorquinolonas, sulfonamidas e ceftiofur em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, arranjo de diodos e espectrometria de massas.

Na análise dos resíduos em leite, a extração líquido-líquido com água ultra pura 10% TCA apresentou melhores resultados de recuperação de analitos em comparação à extração em fase sólida com adsorventes de fase reversa e de troca iônica. A extração aquosa e as condições cromatográficas permitiram a separação e identificação de onze resíduos, com detecção das sulfonamidas e fluorquinolonas por fluorescência e do ceftiofur por arranjo de diodos, compreendendo a análise simultânea de três classes antimicrobianas no leite.

O método quantitativo foi validado em conformidade com a Diretiva EC/657/2002 da Comunidade Européia, obtendo resultados adequados nos critérios de desempenho, como linearidade e faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e robustez.

Resíduos de fluorquinolonas e sulfonamidas foram confirmados através de método qualitativo por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas, de acordo com a Diretiva Européia, apresentando resultados adequados quanto à seletividade, identificação de íons precursores, capacidade de detecção e limite de detecção, fornecendo informações conclusivas para identificação inequívoca dos compostos através de seus fragmentos moleculares.

A aplicação dos métodos quantitativo e confirmatório na análise de 95 amostras reais de leite comprovou o desempenho adequado dos métodos nas análises de leite bovino de diferentes processamentos industriais e marcas comerciais.

Assumindo os preceitos do monitoramento da qualidade do leite, e uma vez que a presença de resíduos tem efeitos na produção e comércio do alimento, bem como na imagem do produto e percepção do consumidor quanto à segurança alimentar, os métodos desenvolvidos representam contribuição viável e eficiente para análise de resíduos de antimicrobianos em leite bovino.



---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADRIAN, J.; PASCHE, S.; PINACHO, D. G.; FONT, H.; DISERENS, J. M.; SÁNCHEZ-BAEZA, F.; GRANIER, B.; VOIRIN, G.; MARCO, M. Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone,  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics in milk. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 769-777, 2009.

ADRIAN, J.; PINACHO, D. G.; DISERENS, J. M.; SÁNCHEZ-BAEZA, F.; GRANIER, B.; MARCO, M. A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Anal Bioanal Chem*, v. 391, p.1703-1712, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Medicamentos veterinários e saúde pública: uma proposta de ação para a ANVISA*. São Paulo: ANVISA, 2001. 19 p.

AGUILERA-LUIZ, M. VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1205, p. 10-16, 2008.

ALABURDA, J., RUVIERI, V., SHUNDO, L., ALMEIDA, A.P., TIGLEA, P., SABINO, M. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pré-coluna e detecção por fluorescência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 1587-1592, 2007.

ALMÉCIJA, M. C.; IBÁÑEZ, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*, v. 288, p. 28-35, 2007.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*, v. 59, p. 183-198, 1999.

BARBOSA, A. M. J.; ARAUJO, T. A.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. A new indirect method based on square-wave

---

voltammetry for ceftiofur *determination* in bovine milk using an alkaline degradation product. *Microchemical Journal*, v. 98, p. 297-302, 2011.

BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Quantitative determination of ceftiofur-related residues in bovine raw milk by LC-MS/MS with electrospray ionization. *Eur Food Res Technol*, v. 217, p. 449-456, 2003.

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

BECONI-BARKER, M. G.; ROOF, R. D.; MILLERIOUX, L.; KAUSCHE, F. M.; VIDMAR, T. J.; SMITH, E. B.; CALLAHAN, J. K.; HUBBARD, V. L.; SMITH, G. A.; GILBERTSON, T.J. Determination of ceftiofur and its desfuroylceftiofur-related metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 673, p. 231-244, 1995.

BEN, W.; QIANG, Z.; ADAMS, C.; ZHANG, H.; CHEN, L. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1202, p. 173-180, 2008.

BENITO-PEÑA, E.; URRACA, J. L.; SELLERGREN, B.; MORENO-BONDI, M. C. Solid-phase extraction of fluoroquinolones from aqueous samples using a water-compatible stoichiometrically imprinted polymer. *Journal of Chromatography A*, v. 1208, p. 62-70, 2008.

BERENDSEN, B. J. A.; ESSERS, M. L.; MULDER, P. P. J.; BRUCHEM, G. D.; LOMMEN, A.; OVERBEEK, W. M.; STOLKER, L. A. M. Newly identified degradation products of ceftiofur and cephalirin impact the analytical approach for quantitative analysis of kidney. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8177-8186, 2009.

BERNAL, J.; NOZAL, M. J.; JIMÉNEZ, J. J.; MARTÍN, M. T.; SANZ, E. A new and simple method to determine trace levels of sulfonamides

---

in honey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7275-7280, 2009.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. Teores de tiamina, riboflavina e piridoxina em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. *Soc. Bras. de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 3, 2000.

BILANDZIC, N.; KOLANOVIC, B. S.; VARENINA, I.; SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; BRSTILO, M.; RUDAN, N. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control*, p. 1-8, *in press*, 2011.

BOGIALLI, S.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; LAGANA, A.; NICOLARDI, S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. *Food Chemistry*, v. 108, p. 354-360, 2008.

BOGIALLI, S.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; LAGANA, A.; TRAMONTANA, G. Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision EC/657/2002. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 794-800, 2009.

BOHM, D. A.; STACHEL, C. S.; GOWIK, P. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8217-8223, 2009.

BOSCHER, A.; GUIGNARD, T. P.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Development of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography - tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. Accepted manuscript, 2010.

BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J. V.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CROUBELS, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p.

---

7964-7976, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 dez. 1999. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=11049>> Acesso em: 16 de junho de 2010.

BRASIL. Instrução Normativa n.º 24, de 22 de julho de 2009. Aprova o anexo II da Instrução: Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes – PNCR animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 22 jul. 2009.

BRASIL. Portaria n.º 45, de 22 de março de 2007. Aprova o Regimento Interno da Secretaria de Defesa Agropecuária. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 mai. 2007.

BRASIL. Resolução RDC n.º 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. In: BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 set. 2003. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/253\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/253_03rdc.htm)> Acesso em: 16 de junho de 2010.

CÁCERES, M. J. R.; CABANILLAS, A. G.; DÍAZ, T. G.; CAÑAS, M. A. Simultaneous determination of quinolones for veterinary use by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 398-402, 2010.

CAI, Z., ZHANG, Y., PAN, H., TIE, X., REN, Y. Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1200, p. 144-155, 2008.

---

CHÁFER-PERICÁS, C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, n. 9, 2010.

CHUNG, H. H.; LEE, J. B.; CHUNG, Y. H.; LEE, K. G. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, v. 113, p. 297–301, 2009.

CINQUINA, A. L.; ROBERTI, P.; GIANNETTI, L.; LONGO, F.; DRAISCI, R.; FAGIOLO, A.; BRIZIOLI, N. R. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection Optimization and validation. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 221-226, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. FAO/OMS. Veterinary drug residues in food. USA, 2009. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/reference/glossary.html>>. Acesso em: 24 jun. 2010.

COMMITTEE ON DRUG USE IN FOOD ANIMALS; PANEL ON ANIMAL HEALTH, FOOD SAFETY, AND PUBLIC HEALTH. *The Use of Drugs in Food Animals: Benefits and Risks*. Washington, National Academy Press, 1999. p. 276.

COSTI, E. M.; SICILIA, M. D.; RUBIO, S. Multiresidue analysis of sulfonamides in meat by supramolecular solvent microextraction, liquid chromatography and fluorescence detection and method validation according to the 2002/657/EC decision. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6250-6257, 2010.

DIÁZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 6, p. 637-646, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Demanda de produção de leite no Brasil. Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

---

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil. Brasil, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/abela0230.php>>. Acesso em: 04 jul. 2011.

EUROPEAN UNION. Commission Decision EC/657/2002 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union*, L221, Brussels, p. 8-36, August, 2002.

EUROPEAN UNION. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Union*, L125, Brussels, p. 10-32, May, 1996.

EUROPEAN UNION. Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L224, Brussels, August, 1990.

FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FONTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*, v. 30, n. 1, p. 80-82, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. Milk and Dairy Products, USA, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/dairy/home.html>>. Acesso em: 17 jun. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. *Codex Alimentarius*. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Rome: FAO, 1996. 119 p.

FORTI, A. F.; SCORTICHINI, G. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica*

---

*Chimica Acta*, v. 637, p. 214-219, 2009.

FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in Milk. *Journal of Chromatography A*, v. 898, p. 185-191, 2000.

GALERA, C.; KACIMI, D.; JOLIVET, A.; BOUSQUET, P. J.; DEMOLY, P. Allergie aux céphalosporines : intérêt des tests cutanés. *Revue française d'allergologie*, v. 50, p. 398-405, 2010.

GAMBA, V. ; TERZANO, C. ; FIORONI, L. ; MORETTI, S.; DUSI, G.; GALARINI, R. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 637, p. 18-23, 2009.

GARCÉS, A.; ZERZANOVA, A.; KUCERA, R.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection. Application to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography A*, v. 1137, p. 22-29, 2006.

GEHRING, T. A.; GRIFFIN, B. WILLIAMS, R.; GEISEKER, C.; RUSHING, L. G.; SIITONEN, P. H. Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 840, p. 132-138, 2006.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n.7, 2005.

GOWIK, P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8051-8058, 2009.

HELLER, D. N.; NGOH, M. A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M. H. Identification of incurred

---

sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, v. 774, p. 39-52, 2002.

HERBERT, S.; RIAUBLANC, A.; BOUCHET, B. ; GALLANT, D. G. ; DUFOUR, E. Fluorescence Spectroscopy Investigation of Acid or Rennet-Induced Coagulation of Milk. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 10, 1999.

HERMO, M. P.; NEMUTLU, E.; KIR, S.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC–UV, LC–FD, LC–MS and LC–MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. *Analytica Chimica Acta*, v. 613, p. 98–107, 2008.

HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine, ovine and caprine milk using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection with ionic liquids as mobile phase additives. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7281-7287, 2009.

HO, C.; SIN, D. W. M.; TANG, H. P. O.; CHUNG, L. P. K.; SIU, S. M. P. Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1061, p. 123-131, 2004.

HOFF, R.; BARRETO, F.; KIST, T. B. L. Use of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography–tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according to European Union 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8254-8261, 2009.

HOLSTEGE, D. M.; PUSCHNER, B.; WHITEHEAD, G.; GALEY, F. D. Screening and Mass Spectral Confirmation of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 406-411, 2002.

---

HOOF, N. V.; WASCH, K.; OKERMAN, L.; REYBROECK, W.; POELMANS, S.; NOPPE, H.; BRABANDER, H. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta*, v. 529, p. 265-272, 2005.

HU, L.; YANG, X.; WANG, C.; YUAN, H.; XIAO, D. Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 856, p. 245-251, 2007.

HUANG, X.; QIU, N.; YUAN, D. Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high eficiência liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8240-8245, 2009.

HUANG, X.; YUAN, D.; HUANG, B. Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using Ether-type column liquid chromatography. *Talanta*, v. 72, p. 1298-1301, 2007.

IDOWU, O. R.; PEGGINS, J. O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, p. 143-153, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. (INMETRO). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01. Março/2003. 35 p.

ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.; MATSUMOTO, H.; MIYAZAKI, Y.; NAGASE, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. Simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 898, p. 95-102, 2000.

---

JACOBSON, G. A.; MARTINOD, S.; CUNNINGHAM, C. P. Determination of ceftiofur in bovine plasma by HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, p. 1249-1252, 2006.

JEONG, S.; SONG, Y.; CHO, J. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 53, p. 209-216, 2009.

KANG`ETHE, E. K. ABOGE, G. O.; ARIMI, S. M.; KANJA, L. W.; OMORE, A. O.; McDERMOTT, J. J. Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya. *Food Control*, v. 16, p. 349-355, 2005.

KANTIANI, L.; FARRÉ, M.; BARCELO, D. Analytical methodologies for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 4285-4295, 2009.

KARCI, A.; BALCIOGLU, I. A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 4652-4664, 2009.

KAUFMANN, A. Validation of multiresidue methods for veterinary drug residues; related problems and possible solutions. *Analytica Chimica Acta*, v. 637, p. 144-155, 2009.

KEEVER, J.; VOYKSNER, R. D.; TYCZKOWSKA, K. L. Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 794, p. 57-62, 1998.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v. 8, p. 1-13, 2008.

KINSELLA, B.; O`MAHONY, J.; MALONE, E.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

---

KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Validation of a liquid chromatography–mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *Journal of Chromatography A*, v. 1140, p. 147-156, 2007.

LAMBA, S.; SANGHI, S. K.; ASTHANA, A.; SHELKE, M. Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 110-115, 2005.

LI, C.; WANG, Z.; CAO, X.; BEIER, R. C.; ZHANG, S.; DING, S.; LI, X.; SHEN, J. Development of an immunoaffinity column method using broad-specificity monoclonal antibodies for simultaneous extraction and cleanup of quinolone and sulfonamide antibiotics in animal muscle tissues. *Journal of Chromatography A*, v. 1209, p. 1-9, 2008.

LI, H.; KIJAK, P. J.; TURNIPSEED, S. B.; CUI, W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: A multi-class method by liquid chromatography–quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 836, p. 22-38, 2006.

LILLENBERG, M.; YURCHENKO, S.; KIPPEN, K.; HERODES, K.; PIHL, V.; SEPP, K.; LÖHMUS, R.; NEI, L. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, 5949-5954, 2009.

MAKESWARAN, S.; PATTERSON, I.; POINTS, J. An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 529, p. 151-157, 2005.

MAMANI, M. C. V.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, v. 117, p. 545-552, 2009.

---

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

MARAZUELA, M. D. BOGIALLI, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 645, p. 5-17, 2009.

MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1034, p. 25-32, 2004.

MARTINS-JÚNIOR, H. A.; KUSSUMI, T. A.; WANG, A. Y.; LEBRE, D. T. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 2, 2007.

MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1202, p. 118-123, 2008.

MAUDENS, K. E.; ZHANG, G. F.; LAMBERT, W. E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1047, p. 85-92, 2004.

McCLURE, E.; WONG, C. Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 1169, p. 53-62, 2007.

McEVOY, J. D. G. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta*, v. 473, p. 3-26, 2002.

---

NIESSEN, W. M. A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 53-75, 1998.

O'DONNELL, J. A.; GELONE, S. P. The newer fluoroquinolones. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 18, p. 691-716, 2004.

PAIGE, J.C.; TOLLEFSON, L.; MILLER, M.A. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.15, p.31-43, 1999.

PARK, H. R.; KIM, T. H.; BARK, M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 6, p. 443-460, 2002.

PECORELLI, I.; GALARINI, R.; BIBI, R.; FLORIDI, Al.; CASCIARRI, E.; FLORIDI, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 483, p. 81-89, 2003.

PÉREZ-TRALLERO, M.; ZIGORRAGA, C. Resistance to antimicrobial agents as a public health problem: importance of the use of antibiotics in animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 6, p. 59-63, 1995.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1087, p. 259-264, 2005.

PRIMEL, E.G. *Aplicação de extração em fase sólida e técnicas cromatográficas para determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório*. 2003. 170f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

PUIG, P.; TEMPELS, F. W. A.; BORRULL, F.; CALLUL, M.; AGUILAR, C.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. On-line coupling of solid-phase extraction and capillary electrophoresis for the

---

determination of cefoperazone and ceftiofur in plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 856, p. 365-370, 2007.

PUIG, P.; BORRULL, F.; CALLUL, M.; BENAVENTE, F.; SANZ-NEBOT, V.; BARBOSA, J.; AGUILAR, C. Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: In-line solid phase extraction and sample stacking techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 587, p. 208-215, 2007.

RAICH-MONTIU, J.; FOLCH, J.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M.; PRAT, M. D. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *Journal of Chromatography A*, v. 1172, p. 186-193, 2007.

RAMBLA-ALEGRE, M.; PERIS-VICENTE, J.; ESTEVES-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Analysis of selected veterinary antibiotics in fish by micellar liquid chromatography with fluorescence detection and validation in accordance with regulation 2002/657/EC. *Food Chemistry*, v. 123, p. 1294-1302, 2010.

RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCIA, E. REUVERS, T.; HOOGHUIS, H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 789, p. 373-381, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia, Fármacos antibacterianos*. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 46, 2007. 663-671 p.

RENEW; J. E.; HUANG, C. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1042, p. 113-121, 2004.

RHIJN, J. A.; LASAROMS, J. J. P.; BERENDSEN, B. J. A.; BRINKMAN, U. A. Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. *Journal of Chromatography A*, v. 960, p. 121-133, 2002.

---

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. S. F.; MELO, L. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUEZ, E.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D. Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of fluoroquinolone residues in powdered infant formulae Application to the analysis of samples from the Spanish and Latin American market. *Journal of Chromatography A*, v. 1209, p. 136-144, 2008.

RODRÍGUEZ, N.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L. A.; HERRERO, A. A multivariate multianalyte screening method for sulfonamides in milk based on front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 657, p. 136-146, 2010.

RUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KRUIF, K. G.; KELLY, A. L. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1764, n. 593-598, 2006.

SCHNEIDER, M. J. Rapid fluorescence screening assay for enrofloxacin and tetracyclines in chicken muscle. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 7809-7813, 2004.

SCHNEIDER, M. J.; DONOGHUE, D. J. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 780, p. 83-92, 2002.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and in food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.17, p. 431-437, 2001.

SMITH, G. W.; GEHRING, R.; RIVIERE, J. E.; YEATTS, J. L.; BAYNES, R. E. Elimination kinetics of ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 224, n. 11, p. 1827-1830, 2004.

---

SORENSEN, L. K.; SNOR, L. K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 882, p. 145-151, 2000.

SOUZA, M. J. *Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo de estabilidade*. 2008. 166f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

STEAD, S. L.; ASHWIN, H.; RICHMOND, S. F.; SHARMAN, M.; LANGEVELD, P. C.; BARENDSE, J. P.; STARK, J.; KEELY, B. J. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotests SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 3-11, 2008.

STOEV, G.; MICHAILOVA, A. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 871, p. 37-42, 2000.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *Journal of Chromatography A*, v. 1067, p. 15-53, 2005.

STOLKER, A. A. M.; ZUIDEMA, T.; NIELEN, M. W.F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 10, p. 967-978, 2007.

STUBBINGS, G.; TARBIN, J.; COOPER, A.; SHARMAN, M.; BIGWOOD, T.; ROBB, P. A multi-residue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. *Analytica Chimica Acta*, v. 547, p. 262-268, 2005.

SU, A.; LIN, C. Determination of riboflavin in urine by capillary electrophoresis-blue light emitting diode-induced fluorescence detection

---

combined with a stacking technique. *Journal of Chromatography B*, v. 785, p. 39-46, 2003.

TAGGART, J. H. *The World Pharmaceutical Industry*. New York, Taylor & Francis, 1993. 471 p.

TENÓRIO, C. G. S. C.; CERQUEIRA, M. M. P.; VIEGAS, R.P.; RESENDE, M. F. S.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K. R.; SOUZA, M. R. PENNA, C. F. A. M. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 2, p. 504-510, 2009.

THOMPSON, T. S.; NOOT, D. K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 551, p. 168-176, 2005.

TOLDRÁ, F.; REIG, M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 482-489, 2006.

TONG, L.; LI, P.; WANG, Y.; ZHU, K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, v. 74, p. 1090-1097, 2009.

TUERK, J.; REINDERS, M.; DREYER, D.; KIFFMEYER, T. K.; SCHIMIDT, K. G.; KUSS, H. Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring—Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection. *Journal of Chromatography B*, v. 831, p. 72-80, 2006.

TUREL, I. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 232, p. 27-47, 2002.

TYCZKOWSKA, K. L.; VOYKSNER, R. D.; ANDERSON, K. L.; ARONSON, A. L. Determination of ceftiofur and its metabolite desfurioylceftiofur in bovine serum and milk by ion-paired liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 614, n. 1, p. 123-134, 1993.

---

WOODWARD, K. The Toxicity of Particular Veterinary Drug Residues. In: WATSON, D. H. (Ed.). *Pesticide, veterinary and other residues in food*. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 723.

XIE, H.; MA, W.; LIU, L.; CHEN, W.; PENG, C.; XU, C.; WANG, L. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheims in milk. *Analytica Chimica Acta*, v. 634, p. 129-133, 2009.

ZHANG, H.; REN, Y.; BAO, X. Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, p. 367-374, 2009.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 1069-1075, 2010.

ZHENG, M. M.; ZHANG, M. Y.; PENG, G. Y.; FENG, Y. Q. Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 625, p. 160-172, 2008.

ZHU, K.; LI, J.; WANG, Z.; JIANG, H.; BEIER, R. C.; XU, F.; SHEN, J.; DING, S. Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, p. 2716-2719, 2011.

ZUIDEMA, T.; MULDER, P. P. J.; LASAROMS, J. J. P.; STAPPERS, S.; RHIJN, J.A.V. Can high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection under all conditions be regarded as a sufficiently conclusive confirmatory method for B-group substances? *Food Additives and Contaminants*, v. 23, n. 11, p. 1149-1156, 2006.