



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**Determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina,
clortetraciclina e doxiciclina em leite bovino por
cromatografia líquida de alta eficiência**

Carolina Kato Prado

Maringá

2012

Carolina Kato Prado

**Determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina,
clortetraciclina e doxiciclina em leite bovino por
cromatografia líquida de alta eficiência**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Maringá

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P896d Prado, Carolina Kato
Determinação de resíduos de oxitetraciclina,
tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite
bovino por cromatografia líquida de alta eficiência/
Carolina Kato Prado.-- Maringá, 2012.
68 f. , figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Machinski Junior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos, 2012.

1. Leite Bovino . 2. Resíduos de medicamentos
veterinários . 3. Tetraciclina . 4. CLAE . 5.
Segurança alimentar . 6. Validação . I. Machinski
Junior, Miguel, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento
de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos. III. Título.

CDD 21.ed. 615.954

JLM000434

Orientador

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior

BIOGRAFIA

Carolina Kato Prado nasceu em 5 de Julho de 1986 na cidade de Presidente Prudente/SP. Possui graduação em Nutrição pelo Centro Universitário Filadélfia – Unifil, e Tecnologia em Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Tem experiência nas áreas de nutrição e ciência e tecnologia de alimentos atuando principalmente nos seguintes temas: alimentos funcionais na prevenção de câncer e toxicologia de alimentos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA KATO PRADO

**Determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina,
clortetraciclina e doxiciclina em leite bovino por cromatografia líquida
de alta eficiência**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Jesui Vergilio Visentainer
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Universidade Estadual de Maringá (Suplente)

Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha
Universidade Estadual de Maringá (Suplente)

Aprovado em: 03 de abril de 2012.

Dedico

*A meus pais, Edson e Neusa, meus
grandes amigos e heróis.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre se mostrar presente, principalmente nos momentos de angústia, por não me deixar desanimar e por dar forças para seguir sempre em frente, em especial no ano de 2011. Obrigada!

A meus pais, por tudo o que fizeram e ainda fazem para minha realização pessoal e profissional. Agradeço pelos ensinamentos, colos, noites mal dormidas, por sempre terem a porta de casa aberta, por torcerem e sofrerem junto comigo. São os maiores responsáveis por essa conquista. Amo-os incondicionalmente.

A meus irmãos, pelo companheirismo, pelos conselhos e por serem meus eternos amigos. Espero retribuir na mesma proporção o que fazem por mim.

Ao Chico, por ser companheiro, entender minhas felicidades e tristezas apenas com o olhar, pelos momentos em que ficou ao meu lado enquanto lágrimas corriam pelo rosto. Sei que mesmo sem entender os motivos, entende minhas emoções e se faz presente.

À minha família, por participar da minha vida, pela torcida e por mostrar meu lugar no mundo.

Aos amigos,

Bia, por sempre estar presente, por compartilhar das angústias de um mestrando, pelo apoio e por ser meu ombro amigo.

Tha e Rafa, por estarem ao meu lado sempre que preciso, mesmo distantes.

Ju, minha primeira colega de profissão, por torcer sempre pelo meu sucesso e pelas conversas sem fim ao telefone. Torço igualmente por você.

Jé, Amanda e Nati, pelas conversas, por participarem do início desse sonho e por lembrarem de mim sempre. Peço desculpas pela ausência desse último ano e agradeço por compreenderem.

Fê, por ter me recebido tão bem no Laboratório, ter emprestado os ouvidos durante o pouco tempo em que convivemos e por ter se tornado essa amiga tão especial.

Marcos, pelas corridas, missas e conversas.

Victor, por ter devolvido cores à minha vida, pelo apoio e torcida no finalzinho do mestrado.

Leo, pelas conversas sobre métodos e por escutar os desabafos durante esse período.

Ao meu orientador, Dr. Miguel Machinski Junior, pela oportunidade, pelos ensinamentos, compreensão, paciência e amizade. Não tenho palavras para agradecer o quanto fez por mim durante esses 2 anos. Peço desculpas por erros e ausências, e espero ter conseguido chegar perto de suas expectativas.

À professora Paula Nishiyama, pela amizade e preocupação. A convivência foi curta, mas significou muito.

Aos funcionários, estagiários e pós-graduandos do Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, por todo auxílio, pelo companheirismo, pela convivência e por tornarem o trabalho agradável. Sentirei muitas saudades de todos.

Aos Professores Dr. Felix e Jesui, por aceitarem o convite de compor a banca examinadora deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, por todo apoio e oportunidade que me deram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse ao fim dessa jornada.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
GENERAL ABSTRACT	123
RESUMO GERAL.....	145
ARTICLE 1	167
Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: Uma revisão.....	178
RESUMO	178
ABSTRACT	189
INTRODUÇÃO	189
Extração de tetraciclinas da matriz leite.....	21
Etapa de limpeza de extratos para tetraciclinas	245
Identificação/quantificação de tetraciclinas	256
Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência	267
Cromatografia líquida de alta eficiência	278
Eletroforese Capilar	30
Confirmação da identidade das tetraciclinas	32
Considerações finais	32
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS	33
ARTICLE 2	389
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM LEITE BOVINO PASTEURIZADO, POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	40
VALIDATION OF A HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINES IN PASTEURIZED BOVINE MILK.....	401
INTRODUÇÃO	412
PARTE EXPERIMENTAL.....	434
Materiais e Reagentes.....	434

Soluções estoque e de trabalho	445
Preparo de amostras.....	445
Equipamentos e condições cromatográficas.....	456
Curvas de calibração.....	46
Validação do método.....	467
<i>Seletividade e especificidade</i>	467
<i>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i>	467
<i>Limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ)</i>	478
<i>Recuperação</i>	489
<i>Precisão</i>	489
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	489
CONCLUSÃO.....	545
REFERÊNCIAS	545
ARTICLE 3	578
Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline and Doxycycline residues in pasteurized cow's milk on Brazilian market.....	59
RESUMO	60
MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
Amostras.....	61
Reagentes, padrões e equipamentos.....	61
Extração e limpeza das amostras.....	62
Determinação dos resíduos de tetraciclinas em leite por CLAE.....	62
Avaliação da exposição a tetraciclinas.....	63
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	64
ACKNOWLEDGEMENTS	66
References	67

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 – Levantamento dos principais métodos analíticos para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite.....	22
---	----

Artigo 2

Tabela 1. Limites de detecção e coeficiente de variação do método avaliado para tetraciclinas.....	51
Tabela 2. Limite de quantificação e coeficiente de variação do método avaliado para tetraciclinas.....	51
Tabela 3. Médias de concentração, recuperação e coeficiente de variação para tetraciclinas para cada nível de fortificação.	53
Tabela 4. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de quantificação ($CC\beta$) para tetraciclinas.....	54
Tabela 5. Resultado de reprodutibilidade do método para tetraciclinas.	54

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1 - Estrutura química das tetraciclinas	20
---	----

Artigo 2

Quadro 1. Gradiente de fase móvel utilizada na análise de tetraciclinas.....	46
Figura 1. Cromatograma de oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) e Doxiciclina (DC). Branco amostra e solução padrão (100 ng/mL).....	50

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de três artigos científicos.

- 1 Carolina Kato Prado, Miguel Machinski Junior. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Aceito para publicação).
- 2 Carolina Kato Prado, Flávio Ferreira Dias, Érika Bando, Miguel Machinski Junior. Validação de metodologia analítica para determinação de oxitetraciclina tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite bovino pasteurizado, por cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova (Submetido)
- 3 Carolina Kato Prado, Flávio Ferreira Dias, Érika Bando, Miguel Machinski Junior. Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline and Doxycycline residues in pasteurized cow's milk on Brazilian market. Journal of Food Protection (A ser submetido).

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. Tetracyclines are a large spectrum class of antibiotic, widely used in prevention and treatment of infection in dairy cattle. Though its indiscriminate use and the disrespect to the withdraw period may result residues in milk, which can cause bacteria resistance, allergies, and economic losses to producers of milk and dairy products. Therefore, surveillance and monitoring of the presence of antibiotics in milk are needed to ensure consumer safety and avoid financial losses. For that, several methods have been used, and the high performance liquid chromatography is preferred by presenting analysis speed, selectivity, accuracy and reproducibility. Moreover, laws of several countries have established safe limits of residues in food (LMR).

OBJECTIVES. (I) Provide information about the methods used in the determination of tetracyclines in milk reported in the literature. (II) Validate a multiresidue method for the determination of tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline) in bovine milk by high performance liquid chromatography with UV-VIS detector according to analytical criteria defined by European Commission 2002/657/EC. (III) Investigate the occurrence of tetracyclines residue in bovine pasteurized milk by high performance liquid chromatography detection system with UV/VIS. (IV) Assessment the population exposure to antimicrobial residues in milk commercialized in the State of Parana, Brazil.

MATERIAL AND METHODS. A review of analytical methods for determination of tetracyclines reported in the literature was performed. Validation of an extraction method, wherein the milk samples were deproteinated with McIlvaine buffer and 20% trichloroacetic acid and cleanup carried out in C18 columns. Tetracyclines have been separated into a high efficiency liquid chromatograph with UV/VIS detector set at 365 nm by a gradient composed of oxalic acid 0.01 mol/L, acetonitrile and triethylamine in C8 column. To investigate the occurrence of tetracyclines, 100 samples were collected in the State of Parana, between March/2010 and October/2011, and analyzed by the validated method. To evaluate the exposure to the tetracyclines residue, it was calculated the Estimated Daily Intake (EDI) according to the JECFA. The EDI was compared to the Acceptable Daily Intake (ADI) from 0 to 0.03 mg/kg body weight (bw).

RESULTS AND DISCUSSION. The steps for determining antibiotic residues in milk are: extraction, cleanup, identification/quantification and confirmation. The main problem with this analysis due the matrix effect that may interfere with the determination of these residues. Therefore, we have investigated methods of extraction and cleanup witch consist of deproteinization and removal of these components, but that are simple and quick. Thus, many researchers have used to solutions and acidic buffers, and solid phase columns. For identification and quantification, the most used techniques are high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, which show precise results and the confirmation is generally made by mass spectrometry. The validated method in this work presented the limits of detection and quantification from 42.3 to 75.8 and 43.2 to 76.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The decision limit ($\text{CC}\alpha$) and detection capability ($\text{CC}\beta$) varied from 114.2 to 143.7 and 129.3 to 188.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Recoveries of tetracyclines in fortified samples were above 82.5%. Of 100 samples analyzed, three were contaminated with values of 121.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for oxytetracycline, 93.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for tetracycline and 134.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for chlortetracycline (61.6

$\mu\text{g/kg}$) and doxycycline ($73.0 \mu\text{g/kg}$). The median of residues of tetracyclines found in the samples was $42.3 \mu\text{g/kg}$ and EDI was $0.05 \mu\text{g/kg bw/day}$ for Brazil, $0.08 \mu\text{g/kg bw/day}$ for the Southern region and $0.07 \mu\text{g/kg bw/day}$ for the State of Parana.

CONCLUSIONS. Among the analytical techniques for the determination of tetracyclines residue in milk, the most commonly used is the high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection system (UV) or diode array. Although there are techniques which have good results, but with lower sensitivity such as capillary electrophoresis, but allows a rapid and less polluting analysis. The method validated in this study for determination of tetracyclines in pasteurized bovine milk, according to regulation 2002/657/EC of the European Union, presented linearity, specificity, selectivity, precision and accuracy. Therefore, this method showed efficiency enough for the monitoring of tetracyclines in milk. Results of analysis of the collected samples showed that the occurrence of tetracyclines in milk was low (3%), but had samples above the MRL (2%), and the risk to the population to these residues in the milk was regarded as negligible (<1% ADI).

Keywords: Bovine milk, Veterinary drug residues, Tetracyclines, HPLC, Food safety, Validation.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. As tetraciclinas são uma classe de antibióticos de largo espectro, muito utilizadas na prevenção e tratamento de infecções no gado leiteiro. Porém seu uso indiscriminado e o não respeito ao período de carência podem gerar resíduos no leite, que podem causar resistência a bactérias, alergias e perdas econômicas aos produtores de leite e seus derivados. Dessa forma, fiscalização e monitoramento da presença desses antimicrobianos em leite são necessários a fim de garantir a segurança dos consumidores e evitar prejuízos financeiros. Para isso, várias metodologias têm sido utilizadas, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência a preferida por apresentar rapidez na análise, seletividade, exatidão e reprodutibilidade. Aliado a isso, legislações de diversos países já estabelecem limites seguros desses resíduos em alimentos (LMR).

OBJETIVOS. (I) Fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de tetraciclinas em leite relatadas na literatura científica. (II) Validar um método multirresíduo para determinação de tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-VIS de acordo com os critérios analíticos definidos pela Comissão Européia 2002/657/EC. (III) Investigar a ocorrência de resíduos de tetraciclinas em leite bovino pasteurizado por cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção UV/VIS. (IV) Avaliar a exposição da população aos resíduos desses antimicrobianos no leite comercializado no Estado do Paraná.

MATERIAL E METODOS. Foi realizada uma revisão das metodologias analíticas para determinação de tetraciclinas relatadas na literatura científica. A validação consistiu de um método de extração, em que as amostras de leite foram desproteinizadas com solução tampão McIlvaine e ácido tricloroacético 20% e a limpeza ocorreu em colunas C18. As tetraciclinas foram determinadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção UV/VIS a 365 nm. A fase móvel em gradiente consistiu de ácido oxálico 0,01 mol/L, acetonitrila e trietilamina. Foi utilizada coluna C8. Para investigação da ocorrência de tetraciclinas, 100 amostras foram coletadas no Estado do Paraná, no período entre Março/2010 e Outubro/2011, e analisadas pelo método validado. Para avaliar a exposição aos resíduos de tetraciclinas foi calculada a Ingestão Diária Estimada (IDE) segundo o JECFA. A IDE foi comparada com a Ingestão Diária Aceitável de grupo (IDA) de 0-0,03 mg/kg peso corpóreo (p.c.), estabelecidas para somatória da presença das tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina).

RESULTADOS E DISCUSSÃO. As etapas para determinação de resíduos de antibióticos no leite são: extração, limpeza, identificação/quantificação e confirmação da identidade dos analitos, sendo a primeira, o principal problema dessa análise devido a matriz conter altos teores de proteínas e lipídios que podem interferir na determinação desses resíduos. Dessa forma, tem-se pesquisado métodos de extração e limpeza que consistem em desproteíntização e retirada desses componentes, mas que sejam simples e rápidos. Assim, muitos pesquisadores optam por soluções e tampões ácidos, e colunas de fase sólida. Para identificação e quantificação, as técnicas mais utilizadas são cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, que apresentam resultados semelhantes e a confirmação geralmente é feita por espectrometria de massas. O método validado nesse trabalho apresentou limites de detecção e quantificação de 42,3 a 75,8 e 43,2 a 76,4 µg/kg, respectivamente. O limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção

(CC β) variaram de 114,2 a 143,7 e 129,3 a 188,7, respectivamente. Recuperações de tetraciclinas em amostras fortificadas ficaram acima de 82,5%. Das 100 amostras analisadas, três estavam contaminadas com valores de 121,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para oxitetraciclina, 93,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para tetraciclina e 134,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para clortetraciclina (61,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e doxiciclina (73,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A concentração mediana de resíduos de tetraciclinas encontrada nas amostras foi de 42,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e a IDE foi de 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia para o Brasil, 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia para a região Sul do país e 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia para o Estado do Paraná.

CONCLUSÕES. Dentre as técnicas analíticas para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite, a mais utilizada é a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção por absorção no ultravioleta (UV) ou por arranjo de diodos. O método validado neste trabalho para determinação de tetraciclinas em leite bovino pasteurizado, segundo a regulamentação 2002/657/EC da União Européia, apresentou-se linear, específico, seletivo, preciso e exato. Portanto, este método apresentou eficiência suficiente para o monitoramento de tetraciclinas em leite de acordo com os requisitos da União Européia. E os resultados das análises das amostras coletadas demonstraram que a ocorrência de tetraciclinas em leite no Brasil foi baixa (3%), porém foram encontradas amostras acima do LMR (2%), e o risco da população a estes resíduos no leite considerado negligenciável (<1%IDA).

Palavras chaves: Leite bovino, Resíduos de medicamentos veterinários, Tetraciclinas, CLAE, Segurança alimentar, Validação.

ARTICLE 1

Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: Uma revisão

Analytical methodology for determination of tetracyclines residues in milk:

A review

Carolina Kato PRADO, Miguel MACHINSKI JUNIOR*

¹Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, Brasil

*Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Toxicologia. Av. Colombo, 5790. Zona 07. CEP 87020-900. Maringá, PR, Brasil. E-mail: mmjunior@uem.br

RESUMO

As tetraciclinas são um grupo de antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em gado leiteiro no Brasil; porém o uso incorreto e o não respeito ao período de carência podem resultar em resíduos destes medicamentos no leite. A presença de resíduos no leite pode causar o desenvolvimento de reações alérgicas nos consumidores desses produtos, resistência em bactérias e prejuízos na produção de produtos lácteos fermentados. Com a finalidade de fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de tetraciclinas em leite, foi realizada uma revisão das metodologias analíticas relatadas na literatura científica.

Neste estudo são abordadas as metodologias cromatográficas e de eletroforese capilar, que têm sido as mais utilizadas.

Palavras-chave. tetraciclinas, cromatografia, eletroforese capilar, leite.

ABSTRACT

Tetracyclines are a group of antibiotics drugs widely used in the treatment and prevention of infectious diseases in dairy cattle in Brazil. Intervals between tetracyclines administration and the withdrawal period should be complied with, in order to avoid the drug residues in milk. Milk containing antimicrobial residues might cause allergic reactions, occurrence of resistant bacteria and losses in manufacturing fermented dairy products. The present paper reviews the analytical methodology currently described in the literature for the determination of tetracyclines in milk. This study reviewed the chromatographic and the capillary electrophoresis, which have been the widely utilized methods.

Keywords. tetracyclines, chromatography, capillary electrophoresis, milk.

INTRODUÇÃO

As tetraciclinas são uma classe de antibióticos que agem contra uma grande variedade de microrganismos, desde bactérias gram-positivas até gram-negativas, e são utilizadas na medicina veterinária no tratamento e profilaxia de infecções¹. A primeira tetraciclina descoberta foi a clortetraciclina a partir do *Streptomyces aureofaciens*, em 1948². Existem oito tetraciclinas comercializadas atualmente, sendo quatro mais

comumente utilizadas em tratamentos de animais destinados à alimentação humana: oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina³ (Figura 1).

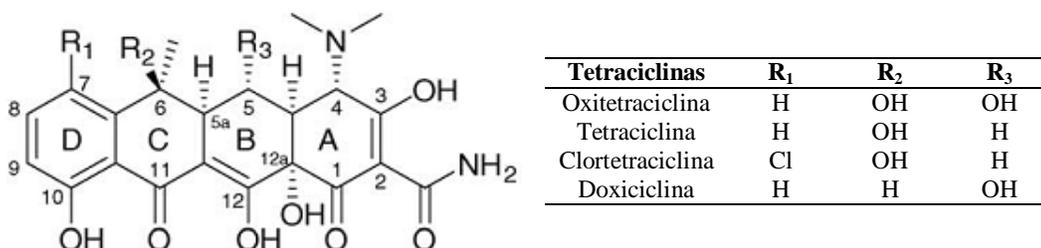


Figura 1 - Estrutura química das tetraciclina

O uso de antimicrobianos em vacas pode levar a presença de resíduos no leite, podendo causar reações alérgicas em consumidores⁴, induzir resistência em bactérias ou ainda afetar o desenvolvimento de culturas utilizadas na obtenção de produtos fermentados⁵. Desta forma, é importante que se identifique os níveis desses resíduos em leite para mantê-los dentro dos limites recomendados e controlar a qualidade de produtos lácteos⁶. Para tanto, testes de inibição microbiológica tem sido usados para a triagem de resíduos de fármacos veterinários em alimentos, porém não são capazes de identificá-los e quantificá-los, assim como os testes imunológicos (ELISA e outros) que apresentam resultados falso positivos ou falso negativos, sendo necessárias ferramentas analíticas específicas⁷.

As etapas envolvidas no procedimento analítico para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite compreendem: extração, limpeza, identificação/quantificação e confirmação. A presente revisão apresenta informações sobre a metodologia analítica para a determinação de resíduos de tetraciclina em leite. Tais métodos são necessários para a fiscalização, monitoramento e pesquisa nos seus

vários aspectos, seja na análise de alimentos, estudos epidemiológicos, verificação da estabilidade durante o processamento de alimentos e condições para descontaminação.

Extração de tetraciclinas da matriz leite

A extração consiste em um dos principais problemas na determinação de resíduos de antibióticos em leite, pois essa matriz contém altos teores de proteínas e lipídios, que podem interferir na análise dos resíduos⁸. Logo, para resolver esse problema, têm-se realizado uma desproteinização utilizando-se ácidos, como o ácido tricloroacético^{7,9}, ácido acético e metanol¹⁰, ácido oxálico e acetonitrila¹¹, ácido perclórico¹², seguida de centrifugação. A retirada da gordura de amostras de leite pode ser realizada com pipetas de Pasteur ou centrifugação, congelando-se as amostras e em seguida descongelando-as, à temperatura ambiente ou em banho de água com agitação à aproximadamente 50°C¹³. A presença de gordura no leite pode obstruir a coluna de extração de fase sólida utilizada na etapa de limpeza e aumentar o tempo deste processo¹⁴. A Tabela 1 apresenta a evolução dos principais métodos de extração, limpeza e identificação/quantificação de resíduos de tetraciclinas em leite.

Samanidou et al¹⁵, para otimizar a extração de tetraciclinas do leite, testaram ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, acetona e acetonitrila como agentes desproteinizantes e verificaram que os dois primeiros tiveram melhores resultados na recuperação dos analitos em amostras adicionadas dos mesmos.

Tabela 1 – Levantamento dos principais métodos analíticos para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite.

Tetraciclinas	Extração	Limpeza	Equipamento	Fase móvel	Coluna	Detector	Limite de Detecção (ng/mL)	Limite de quantificação (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
OTC, TC, CTC, DC	TCA 10% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 mol/L - MeOH-ACN (60:25:15)	C8 (5µm; 250x4,6mm)	DAD (365nm)	-	-	80,3 – 93,3	19
OTC, TC, CTC, DC	-	C8	HPLC	ACN-ác. acético 7% (35:65)	C8 (5µm; 250x4,6mm)	DAD (267 e 361nm)	-	-	80,8 – 95,5	21
OTC, TC, CTC	Tampão succinato de sódio	Resina de Sepharose	HPLC	Ác. oxálico 0,01 mol/L -ACN-MeOH (72:20:8)	C18 (5 µm; 150x4,6mm)	UV-VIS (355nm)	10 – 40	10 – 50	79,7 – 90,5	13
OTC, TC, CTC	Ácido succínico	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 mol/L-ACN-MeOH (75:18:7)	C8 (5 µm; 150x4,6mm)	UV-VIS (370nm)	-	50	79,8 – 87,7	16
MNC, OTC, TC, CTC, DMC, DC, MTC, 4-EOTC, 4-ETC, 4-ECTC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	MeOH-Ác. trifluoroacético 0,01 mol/L	C8 (5 µm; 150x2,1mm)	ESI-MS	1,5-10	50	74,4 – 101	34
OTC, TC, CTC, DC, 4-EOTC, 4-ETC, 4-ECTC	TCA 20%	C18	HPLC	Fase A: 1% de ác. fórmico. Fase B: MeOH-ACN (70:30)	C18 (3µm; 150x2,1mm)	MS	5 – 25	7,1 – 29,4	93,5 - 99,0	9
TC, OTC, 4-ETC	Tampão McIlvaine/EDTA	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 mol/L-ACN-MeOH (150:20:20)	C18 (5 µm; 250x4,6mm)	DAD (365 e 280 nm)	2	-	71,5 – 91,5	14
MNC, TC, OTC, MTC, DMC, CTC, DC	Tampão oxalato e TCA 20%	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 mol/L-ACN	C18 (5 µm; 250x4mm)	DAD (355 nm)	-	-	93,8 – 107,2	15
CTC, OTC, TC	TCA 20% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: Ác. oxálico 0,01 mol/L em 5% ACN. Fase B: Ác. oxálico 0,01 mol/L em 95% ACN	C18 (3,5 µm; 150x2,1mm)	ESI-MS	0,5-3	-	72-106	25
OTC, DC, TC, CTC, ETC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	Ác. Oxálico 0,01 mol/L – ACN	C8 (3,5 µm; 150x4,6mm)	FL (Em 500; Ex 385 nm)	5,1 - 34,7	50	65-110	33

TC, OTC, CTC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	Tris, ác. fórmico, MeOH, ACN	C18	DAD (268nm)	7,14 - 14,9	-	89,83 – 105,2	36
OTC, TC, CTC, DC	Tampão McIlvaine	C8	HPLC	Ác. Oxálico 0,01 mol/L – ACN	C18 (5µm; 250x4,6 mm)	FL	3 – 15	-	50 – 90	18
OTC, DC, CTC, DMC, TC, MTC, 4-EOTC, 4-ETC, 4-EACTC, 4-ECTC, ACTC, , ICTC, α-AOTC, β-AOTC, ATC, 4-EATC	Ác. oxálico 0,01 M em ACN	C18	HPLC	Fase A: Água. Fase B: ACN. Fase C: MeOH	C18 (3µm; 100x2mm)	MS	0,28 – 3,7	0,95 – 12,2	>88,6	11
OTC, TC, CTC, DC, EOTC, ETC, ECTC	TCA 20% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: ác. Fórmico 0,2%. Fase B: ACN em 0,2% de ác. fórmico	C18 (3 µm; 150x2,1mm)	MS	-	-	94 – 103	17
TC, CTC, OTC.	TCA 30% em MeOH e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: cloreto de cálcio 0,075 mol/L, acetato de sódio 0,035 mol/L e EDTA. Fase B: MeOH-ACN (75:25)		DAD (385nm)	20	60	83 – 107	20
TC, OTC, DC	Tampão McIlvaine	C18	CE	Ác. cítrico 20 nmol/L e Na ₂ HPO ₄ 40 nmol/L	Capilar de sílica fundida (64,5x75 µm)	DAD (295nm)	0,5 – 1	1 – 2	81,8 – 99,1	22
TC, CTC, DC, OTC, MTC	TCA 20%	C18	HPLC	ACN-ác. oxálico 0,01 mol/L	C18 (1,7 µm; 50x 2,1mm)	DAD (380, 268, 229 nm)	0,004 – 0,022	0,02-0,08	55,2 – 92	26
OTC, DC, TC, CTC	Ác. Perclórico	-	HPLC	Ác. oxálico 0,010 mol/L – ACN	C18 (5 µm; 150x4,6mm)	DAD (360nm)	7,9 - 35,3	-	98,2 - 102,9	28
OTC, DC, TC, CTC	ACN e Sulfato de magnésio,	-	HPLC	Ác. oxálico 0,01 mol/L – ACN	C18 (5 µm; 150x4,5mm)	DAD (360nm)	0,13 - 0,51	-	95,9 – 104,6	12
TC	TCA	C18	CE	NaOH 0,01 mol/L e borato 0,02 mol/L	Capilar de sílica fundida	DAD (200nm)	0,24	0,72	-	35

Legenda: OTC – oxitetraciclina; TC - tetraciclina ; CTC - clortetraciclina ; DC – doxiciclina; MNC – minociclina; DMC - demeclociclina; MTC - metaciclina; 4-EOTC – 4-epi-oxitetraciclina; 4-ETC – 4-epi-tetraciclina; 4-ECTC – 4-epi-clotetraciclina; 4-EACTC – 4-epianidroclortetraciclina; ACTC – anidroclortetraciclina; ICTC – isoclorotetraciclina; α-AOTC – alfa-apo-oxitetraciclina; β-AOTC – beta-apo-oxitetraciclina; ATC – anidrotetraciclina; 4-EATC – 4-epianidrotetraciclina; EOTC – epi-oxitetraciclina; ETC – epitetraciclina; ECTC – epiclortetraciclina; TCA – ácido tricloroacético; HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, CE – Eletroforese capilar; MeOH – metanol; ACN – acetonitrila; NaOH – hidróxido de sódio; DAD – detector de arranjo de diodos; MS – espectrometria de massas; ESI – Ionização por *electrospray*; FL – fluorescência; µm – micrômetro; mm - milímetro; ng – nanograma; mL – mililitro; nm – nanômetro. Referências apresentadas em ordem cronológica.

As tetraciclina são solúveis em ácidos, bases, alcoóis e solventes orgânicos polares, sendo extraídas com solventes orgânicos como n-butanol, acetato de etila, acetona e acetonitrila³. Andersen et al¹⁶ ao trabalharem com determinação de resíduos de tetraciclina em amostras de leite e camarão utilizaram como solvente da etapa de extração do leite o ácido succínico, obtendo bons resultados de recuperação para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina (86; 87,7 e 79,8%, respectivamente).

Muitos estudos^{6,14,17,18,19,20} têm utilizado a solução tampão McIlvaine para extrair tetraciclina de amostras de leite. Alguns autores^{6,14,18,21} afirmam que esse tampão reduz a complexação das tetraciclina com íons metálicos e com grupos silanóis. A solução tampão é composta por 0,07 mol/L ácido cítrico monohidratado, 0,1 mol/L hidrogenofosfato dissódico dihidratado, 0,01 mol/L ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) diluídos em um litro de água e o pH é ajustado a faixa que se deseja com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio⁶. As tetraciclina são facilmente destruídas em soluções alcalinas, por isso se justifica ajustar o pH da solução tampão para ácido²².

Chico et al¹⁸ testaram o efeito do pH e a da concentração de EDTA na solução tampão McIlvaine e verificaram que ao diminuir o pH de 5,0 para 3,5 ocorre um aumento das taxas de recuperação e reprodutibilidade, porém em pH muito baixo pode ocorrer a precipitação do EDTA na solução. As concentrações de EDTA afetam de forma drástica a recuperação de tetraciclina e oxitetraciclina, verificando-se que a taxa de recuperação de oxitetraciclina aumentou de 20 para 60% quando a concentração de EDTA foi de 0,01 para 0,1 mol/L. Entretanto, altas concentrações desse ácido podem causar problemas de solubilidade.

A procura por procedimentos de extração que utilizem pouco ou nenhum reagente tóxico levou Furusawa²¹ a desenvolver um método de separação de

tetraciclinas do leite bovino, diluindo suas amostras em água à concentração de cinco vezes e passando por coluna de extração de fase sólida diretamente, resultando em amostras livres de compostos interferentes e sem necessidade da etapa de purificação. Essa metodologia permitiu taxas de recuperação maiores de 80% com desvios padrões variando de 1,3 a 4,8.

Etapa de limpeza de extratos para tetraciclinas

Para reduzir interferentes e proteínas, e selecionar a concentração de analitos de interesse, é necessário que os extratos passem por uma etapa de limpeza antes da determinação das tetraciclinas^{15, 23}. Essa etapa é de extrema importância, pois influencia na reprodutibilidade e taxas de recuperação²⁴.

As técnicas mais utilizadas para purificação de antibióticos são extração líquido-líquido e extração por colunas de fase sólida, porém a segunda tem recebido maior atenção por realizar extração e purificação, simultaneamente, em matrizes biológicas devido a sua simplicidade, tempo de operação curto e utilização de quantidades menores de solventes orgânicos²⁵.

Tsai et al¹² trabalharam com extração líquido-líquido com partição induzida por sal (*salting-out*) utilizando Na₂SO₄ e NaCl e em seguida fizeram uma coprecipitação com hidróxido de magnésio, ajustando com água deionizada ao volume de 200 µL e filtrando em membrana de 0,45 µm, podendo ser diretamente injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

Wang e Li²⁶ determinaram simultaneamente 10 resíduos de antimicrobianos em leite e avaliaram diversas colunas comerciais na etapa de purificação. As colunas foram

pré-lavadas com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultra pura. A coluna empacotada com partículas C-8 (ENVI-8) resultou em menores recuperações de oxitetraciclina e tetraciclina do que as colunas do tipo C-18, tendo a coluna HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) apresentado as melhores taxas de recuperação (acima de 80%) para todos os 10 antibióticos avaliados. Nesse mesmo trabalho, os autores testaram quatro reagentes de eluição (metanol e ácido oxálico em metanol nas concentrações de 5, 10, 15 mmol/L) e verificaram que todos resultaram em uma eficiência maior que 80,1%, sendo escolhido para o estudo 4 mL de metanol, não sendo necessária acidificação como recomendado por Gentili et al²⁷.

No entanto, Tong et al²² não conseguiram boa recuperação ao eluir as amostras da coluna de extração fase sólida com metanol, pois houve eluição de interferentes da matriz. Para corrigir este problema, diferentes proporções de metanol-água foram testadas, verificando-se que quanto maior a concentração de água, menos interferentes eram eluídos, porém altas concentrações de água dificultam o processo de concentração sob fluxo de nitrogênio. Desta forma, os autores testaram misturas de acetona e diclorometano como solvente de eluição e concluíram que acetona-diclorometano na proporção de 4:6 (v/v) resulta em boa recuperação para tetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina, eliminando as substâncias interferentes.

Identificação/quantificação de tetraciclinas

A detecção e quantificação de resíduos de tetraciclinas em amostras de leite são realizadas principalmente por técnicas cromatográficas e a eletroforese capilar. Dentre as mais utilizadas estão a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção por absorção no ultravioleta (UV)^{19,21} ou por arranjo de diodos²⁸. A

cromatografia em fase gasosa, apesar de possuir alta resolução, necessita de uma etapa de derivação para determinação de antibióticos, por estes serem polares e não volatilizar suficientemente ou serem instáveis termicamente²⁹.

Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência

Husain et al³⁰ estudaram o comportamento cromatográfico de antibióticos em camada delgada de troca iônica inorgânica, silicato de titânio, com fases móveis orgânica, aquosa e mistura aquosa e orgânica e concluíram que houve uma boa resolução dos antimicrobianos.

Segundo Toldrá e Reig³¹, as vantagens da cromatografia em camada delgada de alta eficiência para detecção de antibióticos são o grande número de amostras para um único analito a ser analisado, o tempo reduzido para obtenção de resultados, a possibilidade de automação, a sensibilidade do método, a especificidade dependendo da técnica de detecção e os analitos separados podem ser recuperados para as análises confirmatórias. A visualização dos componentes pode ser feita por agente cromogênico ou luz UV. Com o uso de densitômetro é possível realizar uma análise quantitativa medindo-se a intensidade relativa da mancha na placa e comparando-se com um padrão.

Apesar de ser uma técnica eficiente para detectar resíduos de antibióticos, tem-se procurado por métodos que possibilitem a identificação e quantificação de forma mais direta e sensível.

Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

As colunas analíticas tipicamente usadas na separação de tetraciclinas são as de fase reversa C₁₈ ou C₈, sendo as mais comuns as empacotadas esféricas e irregulares, geralmente com “end-capping”³². As colunas de fase reversa com “end-capping” são utilizadas preferencialmente pela sua habilidade intrínseca de reduzir interações silanóis. As tetraciclinas, devida a suas duplas ligações, oxigênio e nitrogênio substituintes, reagem com silanóis e traços de metais presentes no material de empacotamento de sílica e podem produzir picos com cauda³².

As fases móveis mais utilizadas na eluição gradiente para tetraciclinas são compostas por 0,01 mol/L de ácido oxálico e acetonitrila³³, ou CaCl₂-acetato de sódio-EDTA e metanol-acetonitrila (75:25, v/v)²⁰ ou água e mistura de metanol/acetonitrila⁹. Enquanto que na eluição isocrática podem ser utilizados ácido oxálico 0,01 mol/L-acetonitrila-metanol em diferentes proporções^{13,14}.

Zhenfeng et al³⁴ utilizaram a coluna C₈ para separação de 7 tetraciclinas e 3 produtos de biotransformação, com taxa de vazão de 0,3 mL/min com baixa pressão da coluna. Nesse estudo todas as tetraciclinas e seus produtos de biotransformação foram separados com o gradiente de metanol e solução aquosa de 0,01 mol/L de ácido trifluoroacético.

As tetraciclinas apresentam forte absorção UV entre 270 e 360 nm em pH ácido e neutro, então o sistema de detecção mais comum é a absorção UV³. Porém outros detectores acoplados a cromatografia líquida de alta eficiência podem ser utilizados para determinação de resíduos de tetraciclinas, como o detector eletroquímico testado por Casella e Picerno⁶. Nesse trabalho, os autores testaram o detector amperométrico usando eletrodo de ouro policristalino operando sob condições de detecção

amperométrica e detecção amperométrica pulsada, verificando que em condições amperométricas a 1,6 V a determinação de tetraciclinas em amostras de leite foi eficiente, enquanto que em condições amperométricas pulsada produziu uma linha base instável e larga na região cromatográfica próxima a do solvente e onde as tetraciclinas foram eluídas, podendo ser resultado da presença de interferentes de matriz com pronunciada atividade eletroquímica.

A determinação de multiresíduos (tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol) em leite bovino foi realizada por Mamani et al²⁰ usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, em que os limites de detecção e quantificação foram de 20 e 60 ng/mL, respectivamente para todos os antimicrobianos, podendo concluir que o método desenvolvido foi adequado para determinação de resíduo de antibióticos em leite e ainda pode-se verificar que a estabilidade das tetraciclinas depende da estrutura química de cada uma, ou seja, a clortetraciclina sob condições de estresse alcalino foi a menos estável e a oxitetraciclina foi a menos estável ao ácido e oxidantes. Tsai et al²⁸ também analisaram amostra de leite por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos e encontraram limites de detecção entre 7,9 e 35,3 ng/g para quatro tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina).

A fluorescência das tetraciclinas depende da sua forma molecular, logo para aumentar a sensibilidade do método, é necessário fazer uma derivação pós-coluna baseada em complexação de metais. Para analisar tetraciclinas em amostras de leite bovino por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, Spisso et al³³ utilizaram Mg^{2+} em solução de dimetilformaldeído (alcalino) e obtiveram o máximo de fluorescência quando utilizaram uma taxa de vazão

de 0,6 mL/min. Nesse trabalho, os autores obtiveram limites de detecção de 5,1; 9,7 e 34,7 µg/kg para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente, e limites de quantificação de 50 µg/kg para as três tetraciclinas. Este método foi capaz de confirmar a presença de tetraciclinas em amostras de leite.

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas por apresentar alta sensibilidade e possibilitar uma análise qualitativa e quantitativa eficiente, sendo possível ainda trabalhar com determinação simultânea de resíduos. Além disso, possibilita o uso do detector UV-Vis, não sendo necessário utilizar reagentes p/ derivação como no caso do detector de fluorescência. Dessa forma, os detectores UV-Vis e de arranjo de diodos tem sido preferidos em análises de resíduos de tetraciclinas.

Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é uma técnica analítica de separação muito utilizada por sua habilidade para determinar diferentes analitos simultaneamente e com alta eficiência e resolução³⁵.

As vantagens da eletroforese capilar na determinação de resíduos de tetraciclinas são simplicidade, rapidez, pouco consumo de solventes, pequena quantidade de amostra, baixa contaminação ambiental, entre outras. Portanto, tem sido considerada uma alternativa efetiva ao método de CLAE, porém a eletroforese capilar acoplada a arranjo de diodos é conhecida por apresentar baixa detectabilidade devido à limitada injeção de amostra e a pequena janela para detecção³⁶.

Resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em leite bovino foram determinados pela primeira vez por eletroforese capilar acoplada a espectrômetro de

massa por Wang et al³⁶. A detectabilidade desse método foi 30 vezes maior do que no método de eletroforese capilar acoplada a arranjo de fotodiodos.

Vera-Candioti et al³⁵, determinando antibióticos em leite bovino cru por eletroforese capilar acoplada a detector de arranjo de diodos, concluíram que o método possui alta eficiência e tempo curto de análise (8 min), podendo ser utilizada para determinação de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite.

A determinação simultânea de seis resíduos de antibióticos, incluindo a tetraciclina, foi realizada por Santos et al³⁷. Nesse trabalho, os autores compararam análises feitas por eletroforese capilar e CLAE ambas acopladas a detector UV-Vis e concluíram que os resultados de recuperação foram semelhantes entre as duas técnicas, tendo obtido para tetraciclina a um nível de fortificação de 2,5 µg/mL 68,8% para CLAE e 66,1% para EC e a um nível de fortificação de 5,0 µg/mL 73,3% CLAE e 73,9% para EC. Ainda foi possível verificar que os dois métodos apresentaram boa repetibilidade e embora a CLAE tenha apresentado menores limites de detecção e quantificação, assim como, separação mais eficiente dos antibióticos, a EC utiliza menores volumes de solventes orgânicos, resultando em menor impacto ambiental.

Dessa forma, verifica-se que o método por eletroforese capilar é econômico, traz menores prejuízos ao ambiente e pode ter bons resultados com uma simples troca de detector, apresentando resultados semelhantes a CLAE, que é uma das técnicas mais utilizadas para determinação de resíduos de tetraciclinas.

Confirmação da identidade das tetraciclinas

A etapa final da metodologia analítica é a confirmação da identidade das tetraciclinas. A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência é um procedimento de confirmação altamente específico na análise de tetraciclinas. Ruyck e Ridder⁹ desenvolveram um método de determinação de tetraciclinas em leite bovino utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com uma interface de ionização de elétrons, que detectou concentrações de resíduos entre 5 e 20 µg/L.

Considerações finais

A determinação de resíduos de antimicrobianos em leite é necessária por se tratar de fármacos amplamente utilizados na medicina veterinária no Brasil e que podem trazer prejuízos para a saúde do consumidor, além de prejuízos econômicos para o produtor e os fabricantes de produtos lácteos. Há muitos fatores limitantes na determinação de tetraciclinas em leite, portanto todas as etapas merecem atenção e cuidado. Recuperações melhores têm sido obtidas com o uso do tampão McIlvaine e colunas de fase sólida (C₁₈) nas etapas de extração e limpeza. Dentre as técnicas analíticas, a mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção por absorção no ultravioleta (UV) ou por arranjo de diodos, embora existam técnicas que apresentem bons resultados, porém com menor sensibilidade como é o caso da eletroforese capilar, que ainda permite uma análise rápida e menos poluente. Muitos autores têm desenvolvido trabalhos para análise de tetraciclinas em leite, porém ainda há uma enorme busca e são necessários melhoramentos para se alcançar metodologias rápidas, fáceis, acessíveis econômica e ecologicamente corretas.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

1. Chopra I, Roberts M. Tetracyclines antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232-60.
2. Duggar BM. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann New York Acad Sci.* 1948; 51:177-81.
3. Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A.* 2000;882(2):109-33.
4. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 36. 1996. [acesso 2010 Out 27]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>].
5. Cogan TM. Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotics. *Appl Microbiol.* 1972;23(5):960-5.
6. Casella IG, Picerno F. Determination of tetracycline residues by liquid chromatography coupled with electrochemical detection and solid phase extraction. *J Agric Food Chem.* 2009;57(19):8735-41.

7. Bogialli S, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Laganà A, Nicolardi S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residue in bovine milk. *Food Chem.* 2008; 108:354-60.
8. Aguilera-Luiz MM, Vidal JLM, Romero-González R, Frenich AG. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008;1205:10-6.
9. Ruyck HD, Ridder HD. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21:1511-20.
10. Msagati TAM, Nindi MN. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography –electrospray mass spectrometry detection. *Talanta.* 2004;64:87-100.
11. Spisso BF, Araújo Junior MAG, Monteiro MA, Lima AMB, Pereira MU, Luiz RA, Nóbrega LAW. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Anal Chim Acta.* 2009;656:72-84.
12. Tsai WH, Huang TC, Chen HH, Huang JJ, Hsue MH, Chuang HY et al. Determination of tetracyclines in surface water and milk by the magnesium hydroxide coprecipitation method. *J Chromatogr A.* 2010;1217:415-8.
13. Ruela ICA, Lima JA, Souza SVC, Junqueira RG. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e

- chlortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Cienc Tecnol Aliment.* 2005;25(1):139-46.
14. Fritz JW, Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 2007;105:1297-301.
 15. Samanidou VF, Nikolaidou KI, Papadoyannis IN. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J Sep Sci.* 2007;30:2430-9.
 16. Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP, Kuck LR. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2005;529:145-50.
 17. Bohm DA, Stachel CS, 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. *J Chromatogr A.* 2009; 1216:8217-23.
 18. Chico J, Meca S, Companyó R, Prat MD, Granados M. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography application to food and environmental analysis. *J Chromatogr A.* 2008;1181:1-8.
 19. Cinquina AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A.* 2003;987:227-33.

20. Mamani MCV, Reyes FGR, Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem.* 2009;117(3):545-52.
21. Furusawa N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. *Talanta.* 2003;59:155-9.
22. Tong J, Rao Q, Zhu K, Jiang Z, Ding S. Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *J Sep Sci.* 2009; 32:4254-60.
23. Yang M, Xu Y, Wang JH. Lab-on-valve system integrating a chemiluminescent entity and in situ generation of nascent bromine as oxidant for chemiluminescent determination of tetracycline. *Anal Chem.* 2006;78:5900-5.
24. Zhang Y, Lu S, Liu W, Zhao C, Xi R. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residue of tetracycline in milk. *J Agric Food Chem.* 2007;55:211-8.
25. Koesukwiwat U, Jayanta S, Leepipatpiboon N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. *J Chromatogr A.* 2007;1149:102-11.
26. Wang L, Li YQ. Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC. *Chromatographia.* 2009;70(1/2):253-8.
27. Gentili A, Perret D, Marchese S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal food products. *Trends Anal Chem.* 2005;24:704-33.
28. Tsai WH, Huang TC, Huang JJ, Hsue YH, Chuang HY. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in

- water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A*. 2009;1216:2263-9.
29. Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Guerrero C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal Chem*. 2007;26(6):466-85.
 30. Husain SW, Ghoulipour V, Sepahrian H. Chromatographic behaviour of antibiotics on thin layers of an inorganic ion-exchanger. *Acta Chromatographica*. 2004; 14:102-9.
 31. Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Science & Technology*. 2006;17:482-9.
 32. Anderson CR, Rupp HS, Wu WH. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2005; 1075:23-32.
 33. Spisso BF, Jesus ALO, Araújo Junior MAG, Monteiro MA. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*. 2007;581:108-17.
 34. Zhenfeng Y, Yueming Q, Xiuyun L, Caini J. Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Chin J Anal Chem*. 2006;34(9):1255-9.
 35. Vera-Candioti L, Olivieri AC, Goicoechea HC. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta*. 2010;82:213-21.
 36. Wang S, Yang P, Cheng Y. Analysis of tetracycline residue in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking. *Electrophoresis*. 2007;28:4173-9.

37. Santos SM, Henriques M, Duarte AC, Esteves VI. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta*. 2007;71:731-7.

ARTICLE 2

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
TETRACICLINAS EM LEITE BOVINO PASTEURIZADO, POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Carolina Kato Prado, Flávio Dias Ferreira, Érika Bando e Miguel Machinski Junior *

Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790,
87020-900 Maringá – PR, Brasil

* Email: mmjunior@uem.br

VALIDATION OF A HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF OXYTETRACYCLINE, TETRACYCLINE, CHLORTETRACYCLINE AND DOXYCYCLINE IN PASTEURIZED BOVINE MILK. A method to determine tetracyclines residues in pasteurized bovine milk was validate, using HPLC-UV/VIS, at 365 nm. The extraction consisted of a deproteinization followed by a clean up in C₁₈ columns. The analites were separated by a gradient system consisting of 0.01 mol/L oxalic acid, acetonitrile and triethylamine in C₈ column. The method presented limits of detection and quantification from 42.3 to 75.8 and 43.2 to 76.4 µg/kg, respectively. The detection limit (CC_α) and detection capability (CC_β) varied from 114.2 to 143.7 and 129.3 to 188.7, respectively. Recoveries of tetracyclines from spiked samples were higher than 82.5% and precision was 7.1%.

Keywords: validation; tetracyclines; HPLC-UV/VIS.

INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são administrados no gado leiteiro para tratamento e prevenção de doenças, além de serem usados como promotores de crescimento.¹ No entanto, o uso desses fármacos veterinários pode resultar em resíduos no leite, que causam prejuízos na saúde dos consumidores, induzindo resistência bacteriana, reações alérgicas, tais como: náuseas, vômitos e irritação gástrica em indivíduos hipersensíveis.² Além disso, a presença de resíduos de antibióticos causa retardo ou inibição do crescimento de bactérias fermentadoras resultando em perdas econômicas para a indústria láctea.³

Pontes Netto et al.⁴ ao realizarem levantamento dos principais medicamentos usados no rebanho leiteiro no Estado do Paraná no período de setembro a outubro de 2003, verificaram que as tetraciclina foram o terceiro principal grupo utilizado. No entanto, isoladamente a oxitetraciclina foi o antimicrobiano mais usado pelos pecuaristas paranaenses. Bando et al.⁵ e Zanella et al.⁶ investigaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite do Estado do Paraná utilizando imunoenaios enzimáticos no período de Março de 2005 a Abril de 2006 e Janeiro de 2006 a Junho de 2007, respectivamente, e verificaram que o grupo das tetraciclina foi o que apresentou maior prevalência entre os antimicrobianos encontrados nas amostras analisadas.

As tetraciclina são uma classe de antibióticos de largo espectro, que agem contra bactérias Gram positivas e negativas.¹ A primeira tetraciclina descoberta foi a clortetraciclina, a partir do *Streptomyces aureofaciens*, por Duggar em 1948.⁷ Atualmente, há oito tetraciclina comercializadas, dentre elas quatro são mais comuns em tratamentos de animais destinados à alimentação humana: oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina.⁸

Nas legislações sanitárias dos países desenvolvidos está estabelecida regulamentação para o uso de antimicrobianos na pecuária, que define os limites máximos de resíduos (LMR) nos alimentos de origem animal.⁹ O *Codex Alimentarius*¹⁰ estabeleceu o LMR para tetraciclina, isolada ou combinada com outros antibióticos da mesma classe, de 100 µg/kg de leite. A União Européia classifica as tetraciclina no grupo B (drogas veterinárias e contaminantes) e estabelece o LMR de grupo em leite de 100 µg/kg para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina isoladas ou combinadas.^{11,12}

Os testes de triagem imunológicos ou de inibição microbiana são mais comumente utilizados para determinação de resíduos de antimicrobianos presentes em leite, porém não são capazes de identificá-los, sendo necessários métodos químicos específicos de identificação e quantificação,¹³ como a cromatografia líquida.^{13,14} A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta alta reprodutibilidade, exatidão e seletividade.¹⁵ As tetraciclina apresentam forte absorção UV entre 270 e 360 nm em pH ácido e neutro, então o sistema de detecção mais comum é a absorção UV.⁸

Em agosto de 2002, a União Européia estabeleceu uma legislação específica (657/EC) para métodos analíticos usados como oficiais para controle de resíduos em produtos de origem animal, que engloba desempenho e interpretação de resultados desses métodos.¹⁶ Visto isso, o objetivo desse trabalho foi validar um método multirresíduo para determinação de tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-VIS de acordo com os critérios analíticos definidos pela Comissão Européia 2002/657/EC.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e Reagentes

Foram utilizados metanol (Honeywell Burdick & Jackson, Muskegon, EUA), acetonitrila (J.T. Baker, Cidade do México, México), trietilamina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), todos de grau cromatográfico; e reagentes de grau PA: ácido cítrico (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), EDTA sal dissódico (Labsynth, São Paulo, Brasil), ácido oxálico cristal (Dinâmica, Diadema, Brasil), fosfato dibásico de sódio anidro (Nuclear, Brasil) e ácido tricloroacético (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA) foi utilizada no preparo das soluções.

Os padrões oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina com graus de pureza de 77%; 95%; 91,3% e 98%, respectivamente, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

Para filtração foram utilizados filtros e millex com membranas PTFE modificada com 0,45 μm (Millipore, Saint Louis, EUA). E para extração foram usados colunas C18 SPE HLB OASIS (Waters, Wexford, Irlanda), 3cc, 60 mg.

Os equipamentos utilizados foram ultra-centrífuga Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha), vortex mixer KMC – 1300V (Vision Scientific CO., LTD, Kyeonggi-do Coréia), lavadora ultrassônica USC 700 (Unique, Indaiatuba, Brasil), vaccum elut (Varian, Walnut Creek, USA), concentrador Tec Vap TE – 0194 (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e balança analítica CP225D (Sartorius, Göttingen, Alemanha)

Soluções estoque e de trabalho

Para cada antibiótico foi preparada uma solução padrão estoque de 1 mg/mL, utilizando 10 mg de padrão para 10 mL de metanol, considerando o grau de pureza de cada padrão de tetraciclina. Estas soluções foram armazenadas a 4°C por aproximadamente 30 dias. A solução padrão de trabalho foi preparada na concentração de 10 µg/mL, a partir das soluções padrões estoques de cada tetraciclina. A cada dia de trabalho foi necessário preparar uma nova solução de trabalho. A solução tampão McIlvaine foi preparada utilizando 11,956 g de sódio fosfato bibásico anidro; 3,72 g de EDTA e 13,0 g de ácido cítrico monoidratado dissolvidos em água ultrapura, segundo Fritz e Zuo.¹⁷ A solução de ácido tricloroacético 20% foi preparada dissolvendo o ácido em água ultrapura.

Preparo de amostras

Foram utilizados leites pasteurizados de diversas marcas adquiridos comercialmente e submetidos a teste rápido por SNAP para tetraciclina. As amostras negativas constituíram o “pool” de leite utilizado para a validação. As amostras foram homogeneizadas e fortificadas, em diversas concentrações, com a solução padrão de trabalho das quatro tetraciclina. Em seguida, 5 mL de amostra de leite foram pipetados em um tubo de polipropileno de 50 mL, acrescentou-se 2 mL de solução de ácido tricloroacético 20% e agitou-se em vórtex. Após a agitação, 20 mL de solução tampão McIlvaine foram adicionados e a mistura foi centrifugada a 1842 g por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado ao cartucho de extração previamente acondicionado com 3 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura. Após a passagem da amostra, o cartucho foi lavado com 2 mL de metanol 5% em água e a eluição das tetraciclina com 3 mL de metanol. A amostra, então, foi concentrada a 35°C e, no

momento da análise, foi reconstituída com 1 mL de metanol, homogeneizada e filtrada em Millex antes de ser injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).¹⁸

As amostras brancas (controle negativo) foram extraídas pelo mesmo procedimento, porém sem adição dos antimicrobianos.

Equipamentos e condições cromatográficas

Para separação das tetraciclinas foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, San Jose, EUA) composto por um injetor automático acoplado a um detector UV-Vis (Thermo Scientific, San Jose, EUA) e coluna Inersil C8-4 (GL Sciences Inc., Tokio, Japão) de dimensões 150x4,6mm; partícula de 5 µm e tamanho de poro de 100Å. As condições cromatográficas foram: fase móvel 1 composta por ácido oxálico 0,01 mol/L-acetonitrila-trietilamina (90:9,9:0,1), e fase móvel 2 de acetonitrila. O cromatógrafo operou a temperatura ambiente (25° C), num comprimento de onda de 365 nm e a corrida de cada amostra teve duração de 10 minutos, no gradiente descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Gradiente de fase móvel utilizada na análise de tetraciclinas.

Tempo (Min)	Fase móvel 1 (%)	Fase móvel 2 (%)	Fluxo (mL/min)
0	85	15	1,5
0,3	70	30	1,2
1,0	70	30	1,5
5	85	15	1,5
10	85	15	1,5

Validação do método

Os parâmetros da validação avaliados foram: seletividade e especificidade, recuperação (exatidão), precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), limites de detecção e quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), todos de acordo com a regulamentação 2002/657/EC da União Europeia.

Curvas Analíticas

As curvas analíticas avaliaram a linearidade e sensibilidade do método e com obtenção dos coeficientes de determinação pode-se determinar a correlação entre as concentrações utilizadas para confecção da curva. Para avaliar esse parâmetro 6 curvas foram construídas para cada analito, com 7 pontos diferentes, incluindo o branco, sendo eles 50, 100, 200, 400, 800, 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cada curva foi construída adicionando-se as quatro tetraciclinas combinadas em extratos de amostras branco.

Seletividade e especificidade

Para avaliar se no tempo de retenção esperado de cada tetraciclina havia a presença de algum interferente, 20 amostras branco foram analisadas.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para obter esses dois limites, 20 amostras branco foram analisadas. O limite de detecção representou o teor mínimo da substância a ser analisada que pode ser detectado numa amostra através do sinal-ruído. Calculou-se esse limite pela equação:

$$LD = \mu_0 + \kappa \sigma_0$$

Onde, μ_0 é a média do teor obtido pelo sinal-ruído e σ_0 é o desvio padrão de μ_0 . κ é a constante de 3,3, considerando que a distribuição é gaussiana e para obter um nível de confiança de 99,7%.

O limite de quantificação correspondeu à mínima concentração da substância a ser analisada que foi possível quantificar. O LQ foi obtido pela equação:

$$LQ = \mu_0 + 10 \sigma_0$$

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

Esses parâmetros foram calculados a partir de 20 amostras fortificadas ao nível do LMR (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). O $CC\alpha$ é o limite a partir do qual uma amostra pode ser declarada não conforme com uma probabilidade de erro α igual a 5%. Calculou-se o $CC\alpha$ pela equação:

$$I_{cc\alpha} = \mu_{LMR} + 1,64 \times \sigma_{LMR}$$

Onde, μ_{LMR} é a média e o σ_{LMR} é o desvio padrão da amplitude de sinal do analito no nível do LMR. Para calcular o $CC\alpha$ utilizou-se uma curva de calibração construída em amostras branco fortificadas (50 a 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para cada tetraciclina.

O $CC\beta$ é o limite a partir do qual uma substância pode ser detectada, identificada e/ou quantificada com uma probabilidade de erro β igual a 5%. Representa a concentração que o método é capaz de detectar no LMR com certeza estatística de 1-, calculada por:

$$I_{cc\beta} = I_{cc\alpha} + 1,64 \sigma_{LMR}$$

Recuperação

Nesse estudo, amostras de leite foram fortificadas nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR (50, 100 e 150 µg/kg), analisou-se cada uma das concentrações em 6 replicatas e calculou-se pela fórmula:

$$\text{recuperação (\%)} = 100 \times \text{Teor medido} \div \text{nível de fortificação}$$

Precisão

A precisão avaliou a repetibilidade e reprodutibilidade do método. Para o primeiro três níveis de fortificação (50, 100 e 150 µg/kg) foram analisadas em 6 replicatas, enquanto para o segundo as mesmas análises foram realizadas porém em três dias diferentes. A repetibilidade e a reprodutibilidade foram apresentadas em coeficiente de variação determinado pela equação:

$$CV = \delta/\mu$$

Onde, σ é o desvio padrão e μ é a média dos resultados.

Os resultados de reprodutibilidade foram conflitados com a equação de Horwitz:

$$CV = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Em que C representa a concentração, expressa em uma potência de 10 (por exemplo 1 µg/mL = 10⁻⁹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na procura de um método simples e rápido para determinação de tetraciclina em leite bovino, nesse trabalho o método desenvolvido por Denobile e Nascimento¹⁹ foi avaliado, porém não foi possível obter a separação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina de forma eficaz. As fases móveis foram mantidas, porém o gradiente e o fluxo foram alterados e obteve-se o cromatograma apresentado na figura 1.

Verificou-se que a amostra branco não apresentou interferentes nas regiões em que os picos de tetraciclinas foram eluídos, indicando a seletividade do método.

Foram construídas ao longo do estudo de validação 6 curvas analíticas para cada tetraciclina analisada em extratos de amostras branco, com concentrações: branco, 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A linearidade do método foi de 50-1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e coeficientes de determinação de 0,9936; 0,9990; 0,9974 e 0,9988 para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente. O método apresentou linearidade e correlação entre as concentrações utilizadas para a confecção da curva.

Na tabela 1 são apresentados os limites de detecção com seus respectivos coeficientes de variação para cada uma das tetraciclinas avaliadas e na tabela 2 os limites de quantificação e seus coeficientes de variação. Observa-se que os dois limites encontram-se abaixo do LMR estabelecido tanto pela União Europeia¹¹ quanto pelo *Codex Alimentarius*,¹⁰ para todas as tetraciclinas analisadas. Os limites de detecção encontrados para oxitetraciclina estão acima dos demonstrados por Furusawa²⁰ e Rassouli et al.²¹ que utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis para determinação de tetraciclinas. Ainda observou-se coeficientes de variação baixos, o que demonstrou pequena variação entre as amostras.

Tabela 1. Limites de detecção e coeficiente de variação do método avaliado para tetraciclinas.

Tetraciclinas	Limite de Detecção ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Coefficiente de Variação (%)
Oxitetraciclina	75,8	0,1
Tetraciclina	49,2	0,2
Clortetraciclina	42,3	0,3
Doxiciclina	53,4	0,3

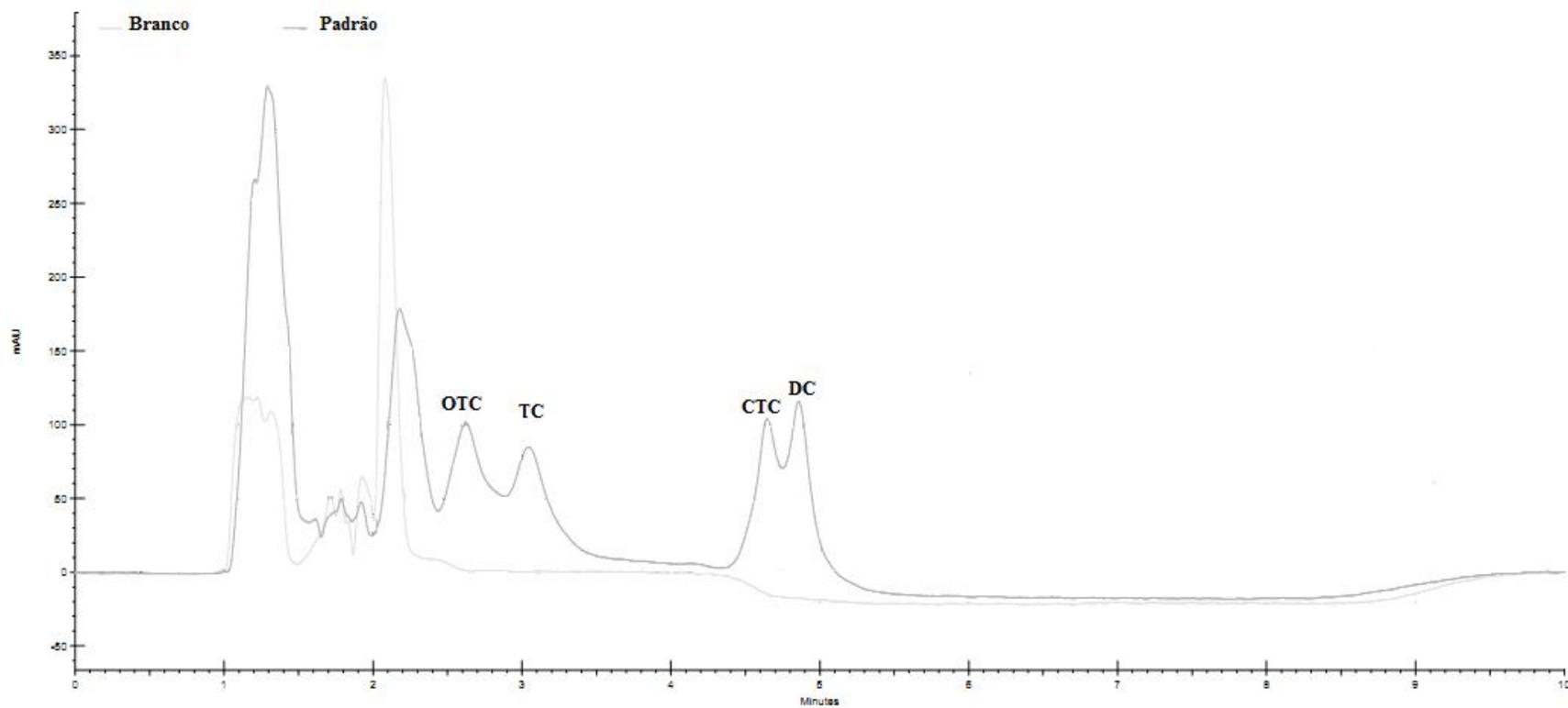


Figura 1. Cromatograma de oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) e Doxiciclina (DC). Amostra branco e amostras branco fortificadas ao nível de 100 ng/mL par cada tetraciclina.

Tabela 2. Limite de quantificação e coeficiente de variação do método avaliado para tetraciclinas.

Tetraciclinas	Limite de Quantificação ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Coeficiente de Variação (%)
Oxitetraciclina	76,4	0,1
Tetraciclina	49,8	0,2
Clortetraciclina	43,2	0,3
Doxiciclina	54,6	0,3

Em relação aos limites de quantificação, Kishida²² encontrou valores de 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para oxitetraciclina e tetraciclina, 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para clortetraciclina e 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para doxiciclina, ou seja, menores do que os encontrados no presente trabalho. Ruela et al.,⁹ também encontraram valores inferiores, principalmente para oxitetraciclina. Porém, Mamani et al.²³ determinando resíduos de tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol em leite bovino obtiveram LQ de 60 ng/mL para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, verificando-se que os valores de LQ do método validado neste trabalho são aceitáveis para determinação desses antibióticos.

Para determinar a recuperação do método, escolheu-se utilizar concentrações de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR (50, 100 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) conforme estipuladas pela União Européia.¹⁶ Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Entretanto, para oxitetraciclina e doxiciclina não foi possível calcular a recuperação na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pois os limites de quantificação para essas duas tetraciclinas foram maiores do que essa concentração. Em geral, as recuperações foram satisfatórias para todas as tetraciclinas, em todas as concentrações variando de 70,7 a 114,5% de acordo com guias elaborados pela "Association of Official Analytical Chemists International – AOAC"²⁴, em que recuperações entre 70 a 120% para concentrações entre 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e 70-110% para concentrações entre 100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ são aceitáveis para validação de métodos multirresíduos.

Na tabela 3 ainda é possível verificar o coeficiente de variação, em que a média das três concentrações das quatro tetraciclinas demonstrou a repetibilidade do método, que seria de 7,1%, considerado aceitável, de acordo com a União Europeia que preconiza coeficiente de variação menores que 15-20% para concentrações entre 10 a 1000 µg/kg, concluindo que o método apresentou boa precisão, quando considerada a repetibilidade.

Tabela 3. Médias de concentração, recuperação e coeficiente de variação para tetraciclinas para cada nível de fortificação.

Tetraciclinas	Nível de Fortificação (µg/kg)	Amostras de Leite		
		Médias de concentração ± desvio padrão (µg/kg)	Recuperação média - % (n=6)	Coefficiente de Variação (%)
Oxitetraciclina	100	98,8 ± 3,1	98,8	3,1
	150	127,9 ± 8,7	85,3	6,8
Tetraciclina	50	52,2 ± 3,6	104,5	6,9
	100	114,1 ± 3,1	114,5	2,7
	150	140,4 ± 8,6	93,6	6,1
Clortetraciclina	100	114,1 ± 3,1	94,2	4,4
	150	123,4 ± 12,7	82,5	10,2
Doxiciclina	100	90,8 ± 2,4	90,8	2,6
	150	141,9 ± 11,4	94,6	8,0

A tabela 4 demonstra os resultados de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de quantificação ($CC\beta$) para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina. Cinquina et al.¹⁸ ao determinarem o $CC\alpha$ para tetraciclinas por CLAE acoplado a detector de arranjo de diodos encontraram valores de 113,2; 114,9; 121,6 e 127 µg/kg para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, valores próximos aos encontrados neste trabalho. Em relação a $CC\beta$, no mesmo trabalho os autores encontraram para oxitetraciclina 117,2 µg/kg, tetraciclina 120,9 µg/kg, clortetraciclina 126,5 µg/kg e para doxiciclina 131,3 µg/kg; valores consideravelmente

mais baixos do que os encontrados no presente trabalho, principalmente para clortetraciclina.

A reprodutibilidade do método é apresentada na tabela 5 em termos de coeficiente de variação. Segundo a regulamentação da União Européia,¹⁶ para concentrações abaixo de 100 µg/kg a aplicação da equação de Horwitz não fornece valores aceitáveis, porque quanto menor a concentração maior será o coeficiente de variação determinado pela equação. Então, os resultados para concentrações de 50 µg/kg não foram apresentados na tabela.

Tabela 4. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de quantificação ($CC\beta$) para tetraciclinas.

Tetraciclinas	$CC\alpha$ (µg/kg)	$CC\beta$ (µg/kg)
Oxitetraciclina	114,2	129,3
Tetraciclina	138,4	176,9
Clortetraciclina	143,7	188,7
Doxiciclina	135,2	160,0

Tabela 5. Resultado de reprodutibilidade do método para tetraciclinas.

Tetraciclinas	Nível de Fortificação (µg/kg)	Coeficiente de variação obtido (%)	Coeficiente de Variação (%) Equação de Horwitz	2/3 do CV (%) Equação de Horwitz	Reprodutibilidade do método (%)
Oxitetraciclina	100	6,9	23	15,3	8,0
	150	9,3			
Tetraciclina	100	6,3			
	150	7,7			
Clortetraciclina	100	12,4			
	150	9,4			
Doxiciclina	100	3,8			
	150	7,8			

Na decisão da União Europeia¹⁶, o valor do coeficiente de variação não pode ultrapassar 2/3 do coeficiente de variação determinado pela equação de Horwitz, nota-se que na tabela 5 esse CV foi de 23% e 2/3 deste resultou em 15,3%; e todos os CVs para todas as tetraciclinas determinadas apresentam-se abaixo deste. A reprodutibilidade encontrada encontra-se abaixo do CV obtido pela equação de Horwitz, logo o método apresentou boa reprodutibilidade.

CONCLUSÃO

O método validado neste trabalho para determinação de tetraciclinas em leite bovino pasteurizado, segundo a regulamentação 2002/657/EC da União Europeia, apresentou-se linear, específico e seletivo, preciso e com exatidão na faixa de 82,5 a 114,5%. Foram determinados limites de detecção entre 42,3 e 75,9 µg/kg e de quantificação entre 43,2 e 76,4 µg/kg. Além disso, o limite de decisão e a capacidade de quantificação foram encontrados nas faixas de 114,2 a 143,7 µg/kg e 129,3 a 188,7 µg/kg, respectivamente. Portanto, o método avaliado apresentou eficiência suficiente para o monitoramento de tetraciclinas em leite de acordo com os requisitos da União Européia.

REFERÊNCIAS

1. Chopra, I.; Roberts, M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 232.
2. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>, acessada em Outubro 2010.
3. Cogan, T. M.; *Appl. Microbiol.* **1972**, *23*, 960.
4. Pontes Netto, D.; Lopes, M. O.; Oliveira, M. C. S.; Nunes, M. P.; Machinski Junior, M.; Bosquiroli, S. L.; Benatto, A.; Benini, A.; Bombardelli, A. L. C.; Vedovello Filho,

- D.; Machado, E.; Belmonte, I. L.; Alberton, M.; Pedroso, P. P.; Scucato, E. S.; *Acta Scient. Anim. Sci.* **2005**, 27, 145.
5. Bando, E.; Oliveira, R.C.; Ferreira, G. M. Z.; Machinski Junior, M.; *J. Food Protection.* **2009**, 72, 911.
6. Zanella, G. N.; Mikcha, J. M. G.; Bando, E.; Siqueira, V. L. D.; Machinski Junior, M.; *J. Food Protection.* **2010**, 73, 1684.
7. Duggar, B. M.; *Ann. New York Academic Sci.* **1948**, 51, 177.
8. Oka, H.; Ito, Y.; Matsumoto, H.; *J. Chromatogr., A.* **2000**, 882, 109.
9. Ruela, I. C. A.; Lima, J. A.; Souza, S. V. C. de; Junqueira, R. G.; *Ciênc. Tecnol. Alim.* **2005**, 25 1, 139.
10. <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>, acessada em Outubro 2010.
11. Council Regulation no. 2377/90, *Off. J. Eur. Commun.*, 20 Junho 1990, No. L224.
12. Council Directive no. 96/23/EC, *Off. J. Eur. Commun.*, 29 Abril 1996, No. L125/10.
13. Bogialli, S.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Nicolardi, S.; *Food Chem.* **2008**, 108, 354.
14. Aguilera-Luiz, M. M.; Vidal, J. L. M.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr., A.* **2008**, 1205, 10.
15. Wang, L. F.; Peng, J. D.; Liu, L. M.; *Anal Chim. Acta.* **2008**, 630, 101.
16. Commission Decision no. 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.*, 12 August 2002, No. L221/8.
17. Fritz, J. W.; Zuo, Y.; *Food Chem.* **2007**, 105, 1297.
18. Cinquina, A. L.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R.; *J. Chromatogr., A.* **2003**, 987, 227.

19. Denobile, M.; Nascimento, E. S.; *Rev. Bras. Cienc. Farmac.* **2004**, *40* 2, 209.
20. Furusawa, N.; *J. Chromatogr., A.* **1999**, *839*, 247.
21. Rassouli, A.; Abdolmaleki, Z.; Bokaee, S.; Kamkar, A.; Shams, Gh. R.; *Int. J. Vet. Res.* **2010**, *4*, 1.
22. Kishida, K.; *Food Chem.* **2011**, *126*, 687.
23. Mamani, M. C. V.; Reyes, F. G. R.; Rath, S.; *Food Chem.* **2009**, *117*, 545.
24. AOAC; *Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals*, AOAC: Washington, 1999.

Legenda: min – minuto; % - porcentagem; mL – mililitros. Fase móvel 1: ácido oxálico 0,01 mol/L:acetonitrila:trietilmina (90:9:1)

Legenda: µg – microgramas; kg – quilogramas; % - porcentagem.

Legenda: µg – microgramas; kg – quilogramas; % - porcentagem.

Legenda: µg – microgramas; kg – quilogramas; % - porcentagem.

Legenda: µg – microgramas; kg – quilogramas.

Legenda: µg - microgramas; kg – quilogramas; % - porcentagem.

ARTICLE 3

RESEARCH NOTE**Ocorrência de resíduos de Tetraciclinas em leite pasteurizado****Resíduos de Oxitetraciclina, Tetraciclina, Clortetraciclina e Doxiciclina em leite
bovino pasteurizado comercializado no Brasil**

Prado, C. K., Ferreira, F. D., Bando, E., Machinski Jr., M.*

Departamento de Ciências Básica da Saúde, Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil

Palavras-chave: Leite bovino brasileiro, Resíduos de fármacos veterinários, Tetraciclinas, HPLC, Segurança Alimentar

*Autor para correspondência:

Tel: +55 44 3011 4565 Fax: +55 44 3011 4489

E-mail: mmjunior@uem.br

RESUMO

A ocorrência de resíduos de tetraciclinas em leite bovino pode causar efeitos adversos ao consumidor e perdas econômicas aos produtores. Logo, o objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência de resíduos de tetraciclinas em leite bovino pasteurizado, utilizando cromatografia em fase líquida de alta eficiência com sistema de detecção UV/VIS e avaliar a exposição da população paranaense aos resíduos desses antimicrobianos. Foram analisadas 100 amostras coletadas no Estado do Paraná, Brasil, das quais 3 estavam contaminadas apresentando valores de 121,8 µg/kg para oxitetraciclina, 93,5 µg/kg para tetraciclina e 134,6 µg/kg para a somatória de clortetraciclina (61,6 µg/kg) e doxiciclina (73,0 µg/kg). A concentração mediana de resíduos de tetraciclinas encontrada nas amostras foi de 42,3 µg/kg e a Ingestão Diária Estimada foi de 0,05 µg/kg p.c./dia para o Brasil, 0,08 µg/kg p.c./dia para a região Sul do país e 0,07 µg/kg p.c./dia para o Estado do Paraná. Os resultados demonstraram que a ocorrência de tetraciclinas em leite no Brasil foi baixa (3%), porém foram encontradas amostras acima do LMR (2%), e o risco da população a estes resíduos no leite considerado baixo (<1% IDA).

As tetraciclina são antibióticos que atuam contra bactérias Gram negativas e positivas, organismos atípicos como clamídia e micoplasmas, e ainda parasitas protozoários e por isso são largamente utilizadas em infecções animais (4). Porém, o uso indiscriminado desses antimicrobianos no gado leiteiro e o não cumprimento do tempo de carência podem resultar em resíduos no leite (15). A presença de resíduos de antibióticos causa prejuízos econômicos para indústrias lácteas, devido ao retardo ou inibição do crescimento de bactérias fermentadoras (6). Além do efeito nocivo a saúde dos consumidores, pois induzem a resistência bacteriana, um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, e reações alérgicas, como: náuseas, vômitos e irritação gástrica (10).

Recentemente, a ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos tem sido um tema de ampla discussão internacional sobre avaliação de risco e estabelecimento de limites máximos de resíduo (LMR) (18). O *Codex Alimentarius* e a União Européia estabeleceram limites máximos de resíduo (LMR) de 100 µg/kg para tetraciclina isoladas ou combinadas em leite (5,7). Portanto, há a necessidade de monitorar a presença destes resíduos de antibióticos nesse alimento.

Os objetivos deste artigo são investigar a ocorrência de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite bovino pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção UV/VIS e avaliar a exposição da população paranaense aos resíduos desses antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras. Cem amostras de leite bovino pasteurizado foram coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais no Estado do Paraná, Brasil, no período de março/2010 a outubro/2011, transportadas ao laboratório sob gelo e armazenadas a -20°C até o momento da análise.

Reagentes, padrões e equipamentos. Foram utilizados metanol (Honeywell Burdick & Jackson, Muskegon, MI), acetonitrila (J.T. Baker, Cidade do México, México), trietilamina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), de grau cromatográfico; e os reagentes de grau analítico: ácido cítrico (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), EDTA sal dissódico (Labsynth, São Paulo, Brasil), ácido oxálico cristal (Dinâmica, Diadema, Brasil), fosfato de sódio bibásico anidro (Nuclear, Brasil) e ácido tricloroacético (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) foi utilizada no preparo das soluções. Para filtração foram utilizados filtros com membranas PTFE modificada com 0,45

µm (Millipore, Bedford, MA). E para extração foram usadas colunas C18 SPE HLB OASIS (Waters, Wexford, Irlanda), 3cc, 60 mg. Os padrões de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina com graus de pureza de 77%; 95%; 91,3% e 98%, respectivamente, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

Para cada antibiótico foi preparada uma solução padrão estoque de 1 mg/mL, utilizando 10 mg de padrão para 10 mL de metanol. A partir da solução padrão estoque, uma solução padrão de trabalho na concentração de 10 µg/mL foi obtida contendo as quatro tetraciclinas. A solução tampão McIlvaine foi preparada de acordo com Fritz e Zuo (8).

Os equipamentos utilizados foram ultra-centrífuga Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany), vortex mixer KMC – 1300V (Vision Scientific CO., Kyeonggi-do, Korea), lavadora ultrassônica USC 700 (Unique, Indaiatuba, Brasil), vaccum elut (Varian, Walnut Creek, CA), concentrador Tec Vap TE – 0194 (Tecnal, Piracicaba, Brasil), balança analítica CP225D (Sartorius, Göttingen, Germany). O cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) utilizado foi o Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, San Jose, CA) composto por um injetor automático PLUS, Bomba quaternária PLUS acoplado a um detector UV-Vis PLUS (Thermo Scientific, San Jose, CA).

Extração e limpeza das amostras. As amostras foram homogeneizadas e 5 mL foram pipetados em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, acrescentou-se 2 mL de solução de ácido tricloroacético 20% em agitador mecânico durante 1 min. Após a agitação, 20 mL de solução tampão McIlvaine foram adicionados e a mistura foi centrifugada a 1842 g por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado ao cartucho de extração C18 pré-condicionado com 3 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura. Após a passagem da amostra, o cartucho foi lavado com 2 mL de metanol 5% e a eluição das tetraciclinas com 3 mL de metanol. O eluato foi evaporado a 35°C sob fluxo de nitrogênio e conservado a -20°C até o momento da análise por CLAE (18), no máximo 24 horas.

Determinação dos resíduos de tetraciclinas em leite por CLAE. O resíduo foi reconstituído com 1 mL de metanol, homogeneizado e filtrado em Millex antes de ser injetado no CLAE. Para separação das tetraciclinas foi utilizada coluna C8 Inertsil C8-4 (GL Sciences Inc, Tokio, Japão) de dimensões 150x4,6mm ID; partículas de 5 µm de poro de 100Å; fase móvel 1 composta por ácido oxálico 0,01 mol/L, acetonitrila, trietilamina (90:9,9:0,1), e fase móvel 2 constituída de acetonitrila, com gradiente segundo quadro 1. As condições cromatográficas foram: comprimento de onda de 365 nm,

corrida de 10 minutos para cada amostra e temperatura ambiente. Para a determinação da concentração de tetraciclina foram utilizadas curvas analíticas no extrato para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml, com tempo de retenção de 2,4 minutos para oxitetraciclina, 2,9 minutos para tetraciclina, 4,5 minutos para clortetraciclina e 4,8 minutos para doxiciclina. A adição das concentrações acima foi realizada em um pool de leite sem a presença de tetraciclina. Os limites de detecção encontrados para o método foram 42,3; 49,2; 53,4 e 75,8 µg/kg para clortetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina, respectivamente. As recuperações médias obtidas foram 90,8% para doxiciclina, 94,2% para clortetraciclina, 98,9% para oxitetraciclina e 114,5% para tetraciclina.

Avaliação da exposição a tetraciclina. O consumo de leite no Brasil foi estimado pela aquisição domiciliar per capita anual apresentada na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009) feita pelo IBGE (9). Segundo essa pesquisa, a ingestão diária de laticínios foi de 119,75 g per capita no país, destes 70,25 g foram de leite bovino pasteurizado. Na região Sul do Brasil, o consumo foi de 117,98 g e no estado do Paraná de 99,70 g. Para avaliar a exposição aos resíduos de tetraciclina foi calculada a Ingestão Diária Estimada (IDE) segundo o JECFA (12), multiplicando a concentração mediana de resíduos de tetraciclina encontrados no leite apresentados neste trabalho pelos dados de consumo de leite (9) e dividindo pelo peso corpóreo de 60 kg. A IDE foi comparada com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0-0,03 mg/kg peso corpóreo (p.c.) estabelecido pelo JECFA (11).

RESULTADOS

A frequência de amostras de leite bovino positivas para tetraciclina foi de 3%. Duas amostras excederam o LMR (121,8 e 134,6 µg/kg). Uma amostra (1%) apresentou resíduo de oxitetraciclina na concentração de 121,8 µg/kg. Outra amostra (1%) continha resíduo de tetraciclina no teor de 93,6 µg/kg. Ainda, uma amostra apresentou resíduos de clortetraciclina e doxiciclina combinadas em níveis de 61,6 e 73,0 µg/kg, respectivamente.

A concentração média de resíduos de tetraciclina encontrada nas amostras foi de 44,5 µg/kg e a mediana de 42,3 µg/kg. Logo, a IDE para leite pasteurizado no Brasil foi de 0,05 µg/kg p.c./dia; 0,08 µg/kg p.c./dia para a região Sul do país e 0,07 µg/kg p.c./dia para o Estado do Paraná. O risco foi considerado negligenciável, uma vez que a IDE foi inferior a 1% da IDA.

DISCUSSÃO

Entre março de 2005 a abril de 2006 e janeiro de 2006 a Junho de 2007, Bando et al. (3) e Zanella et al. (19), respectivamente, avaliaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite do Estado do Paraná utilizando imunoenaios enzimáticos e observaram que o grupo das tetraciclina foi o que apresentou maior prevalência entre os antibióticos encontrados nas amostras de leite. No estudo de Bando et al. (3), 41 (27,2%) amostras de leite estavam contaminadas com esta classe de antibióticos. Zanella et al. (19) trabalharam com um número maior de amostras e encontraram 48 amostras (18,5%) com resíduos de tetraciclina. Porém, devido a esses testes não serem capazes de identificar e quantificar as tetraciclina, não se pôde verificar quais moléculas estavam presentes nessas amostras. A partir desses dados, nota-se que houve uma diminuição de amostras contaminadas no Estado do Paraná, Brasil, entre os anos de 2005 e 2011. Conflitando os resultados deste trabalho com os anteriores, observa-se que poucas amostras apresentaram-se positivas, o que pode ser resultado de melhoria da qualidade do leite ou do método analítico utilizado, a CLAE com sistema de detecção UV-VIS.

Em contrapartida, Mamani et al. (13), para testar o método validado para determinação de tetraciclina, sulfonamidas e cloranfenicol usando CLAE com detecção por arranjo de diodos, avaliaram 16 amostras de leite pasteurizado coletadas na cidade de Campinas, Brasil, em 2006, verificando que os antimicrobianos das amostras ficaram abaixo do LD do método validado (20 µg/kg), ou seja, abaixo do LMR estabelecido pela União Européia. Verifica-se que esse estudo foi realizado no mesmo período dos trabalhos do Estado do Paraná, logo, observa-se que no Estado de São Paulo não havia prevalência de contaminação por tetraciclina em leites bovinos.

Alomirah et al. (2) realizaram um estudo de prevalência de resíduos de antimicrobianos em leite e derivados no Kuwait utilizando testes rápidos e confirmação para tetraciclina por CLAE acoplado a espectrômetro de massa, e verificaram que para leites pasteurizados houve maior prevalência para tetraciclina no período de abril/2004 a fevereiro/2005, encontrando 7,7% de amostras de produtores locais acima do LMR e 7,1% de amostras acima do limite para leites pasteurizados importados. Nesse trabalho, os autores ainda fizeram confirmação para 4 amostras de leite, encontrando em duas resíduos de oxitetraciclina. Spisso et al. (16) em um trabalho realizado no Rio de Janeiro, Brasil, criaram um teste

piloto para verificar a ocorrência de resíduos de tetraciclina em leites pasteurizados comercializados na região metropolitana dessa cidade entre outubro/2009 a março/2010, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa, e encontraram 14 amostras em 100 contaminadas com resíduos de oxitetraciclina e uma amostra com tetraciclina, porém nenhuma amostra apresentou concentrações acima do LMR. Nota-se que os antibióticos da classe das tetraciclina são utilizados em vários países, sendo os antimicrobianos de maior prevalência quando realizados estudos de determinação de multirresíduos. Observa-se também que a oxitetraciclina é a mais encontrada dentre as tetraciclina como mostrado nesses estudos e no presente trabalho.

Abbasi et al. (1) analisaram amostras de leite cru, pasteurizado e esterilizado, no Irã, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e verificaram que o leite pasteurizado apresentou maior número de amostras (22/90) com resíduos de tetraciclina acima de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo a clortetraciclina, o antibiótico em maior concentração. Verifica-se que o leite pasteurizado apresentou maior contaminação por tetraciclina e apesar da oxitetraciclina ser encontrada em trabalhos de diversos países como prevalente, outros antibióticos da classe também podem ter prevalência em alguns países, como no Irã.

Martins-Junior et al. (14) enfatizam a importância de programas de monitoramento de qualidade em alimentos ao desenvolverem um método multirresíduos em leite utilizando CLAE e detecção por espectrometria de massas. Nesse trabalho, 12 amostras de leite foram analisadas, sendo 3 de leite pasteurizado, porém não se detectou a ocorrência de tetraciclina.

A região Sul é a maior consumidora de leite pasteurizado do Brasil, porém o Paraná é o estado dessa região com o menor consumo de leite pasteurizado (9). Em relação à avaliação de risco, verifica-se que todos os valores encontrados para IDE para o Brasil, região Sul e Estado do Paraná encontraram-se abaixo da IDA de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia determinada pelo JECFA (11). Vragovic et al. (17) realizaram um trabalho de avaliação de risco na Croácia e encontraram valor maior para IDE (0,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia) para tetraciclina em leite, porém também abaixo da IDA, concluindo que a ingestão diária provável média nesse país é baixa e o risco é negligenciável. Portanto, este estudo demonstra que o Brasil apresentou um risco negligenciável para resíduos de tetraciclina em leite.

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que há baixa ocorrência de resíduos de tetraciclina em leite produzido e comercializado no Estado do Paraná, Brasil, o que pode indicar uma melhoria na qualidade desse alimento ao longo dos anos, podendo ser devido à conscientização dos produtores sobre manejo do gado leiteiro e respeito ao período de carência. Além disso, a IDE foi baixa e o risco considerado negligenciável. Porém, foram encontradas amostras com presença de resíduos de tetraciclina acima do LMR (2%), sendo necessários programas de monitoramento e métodos de confirmação mais eficientes, como a CLAE.

ACKNOWLEDGEMENTS

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

References

1. Abbasi, M. M., H. Babaei, M. Ansarin, A. Nourdadgar, and M. Nemati. 2011. Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method. *Adv. Pharm. Bull.* 11:34-39
2. Alomirah, H., H. Al-Mazeedi, A. Al-Zenki, T. Al-Aati, J. Al-Otaibi, M. Al-Batel, and J. Sidhu. 2007. Prevalence of antimicrobial residues in milk and Dairy Products in the state of Kuwait. *J. Food Qual.* 30:745-763.
3. Bando, E., R. C. Oliveira, G. M. Z. Ferreira, and M. Machinski Junior. 2009. Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the State of Paraná, Brazil. *J. Food Prot.* 72:911-914.
4. Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracyclines antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol.Rev.* 65:232-260.
5. Codex Alimentarius – Official Standards – *Veterinary drugs MRLs*. Available at: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>. Accessed in: Oct 27, 2010.
6. Cogan, T. M. 1972. Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotics. *Appl. Microbiol.* 23:960-965.
7. Council Directive no. 96/23/EC, Off. April 29, 1996. *J. Eur. Commun.*, No. L125/10.
8. Fritz, J. W., and Zuo, Y. 2007. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 105:1297-1301.
9. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008-2009. Available at: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf. Accessed in: Feb 17, 2012.
10. Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). 1996. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 36. Available at: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>. Accessed in: Oct. 27 2010.
11. Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). 2003. Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Tetracycline. Available at: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_2243.htm. Accessed in: Feb 17, 2012.

12. Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). 2006. *Evaluation of certain veterinary drug residues in food*. Geneva, WHO Technical Report Series 939.
13. Mamani, M. C. V, F. G. R. Reyes, and S. Rath. 2009. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem.* 117:545-552.
14. Martins-Júnior, H. A., T. A. Kussumi, A. Y. Wang, and D. T. Lebre. 2007. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 18:397-405.
15. Nisha, A. R. 2008. Antibiotic residues – a global health hazard. *Vet. World.* 1:375-377.
16. Spisso, B. F., M. A. Monteiro, M. U. Pereira, R. G. Ferreira, R. P. da Costa, T. A. Cruz, and A. W. Nóbrega. 2010. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan are of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. *Food Addit. Contam.* 3:220-227.
17. Vragovic, N., D. Bazulic, and B. Njari. 2011. Risk assessment of streptomycin and tetracycline residues in meat and milk on Croatian market. *Food Chem.Toxicol.* 49:352-355.
18. Woodward, K. N. 2009. Assessment of user safety, exposure and risk to veterinary medicinal products in the European Union. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50:114-128.
19. Zanella, G. N., J. M. G. Mikcha, E. Bando, V. L. D. Siqueira, and M. Machinski Junior. 2010. Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. *J. Food. Prot.* 73:1684-1687