

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

**TETRACICLINAS EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS E PRODUTOS  
LÁCTEOS**

Luiz Severo da Silva Júnior

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
(Orientador)

Profa. Dra. Susanne Rath  
(Co-orientadora)

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

Campinas - SP  
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Si38t Silva Júnior, Luiz Severo  
Tetraciclina em medicamentos veterinários e  
produtos lácteos / Luiz Severo da Silva Junior. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes  
Co-orientador: Susanne Rath  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Leite. 2.logurte. 3.Cromatografia liquida de alta  
eficiência. 4.Tetraciclina. 5.Analise por injeção de  
fluxo. I.Reyes Reyes, Felix Guillermo. II.Rath,  
Susanne. III.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
IV.Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Eidiomar Angelucci  
(Membro)

---

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento  
(Membro)

---

Profa. Dra. Silvia de Oliveira Santos Cazenave  
(Membro)

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy  
(Membro)

---

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig  
(Membro)

---

Profa. Dra. Verônica Lobato  
(Membro)

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a meu Professor e Orientador, Felix Guillermo Reyes Reyes, pela sua orientação e empenho durante a realização deste trabalho.

À Professora Susanne Rath pela cooperação e determinação em todos os momentos que foi necessário.

Aos Professores Eidiomar Angelucci, Elisabeth de Souza Nascimento, Salvador Massaguer Roig, Silvia Cazenave e Verônica Lobato, pelas valiosas sugestões para esta tese.

Meu agradecimento para a Professora Helena Teixeira Godoy, pelas observações feitas neste trabalho e apoio no decorrer do desenvolvimento do curso. Ela que nunca hesitou quanto à ética ou à intensidade de seu trabalho.

À colaboração do Marcello Garcia Trevisan e Ronei Poppi, pela ajuda, quando este trabalho começou a se tornar mais difícil.

Ao SIDAN, na pessoa da Luciana, pelo fornecimento de material de apoio de suma importância para a aquisição de dados atualizados.

Ao CNPq, pelo financiamento concedido, para a realização desta pesquisa

Ao amigo Gustavo Tayar Peres, pelo apoio e incentivo.

Muitas outras pessoas foram de grande importância, incluindo Rodrigo Catarino, Professor Marcelo Prado, Professor Walter J. M. Migliorini, Samanta, Elede e Camila.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, nas pessoas do Marcos Sampaio, Jardete, Marquinho, Maria José, Mauro e Creuza pelo apoio sempre que necessário.

Meu sincero amor e agradecimento a meus pais, Luiz Severo e Terezinha, que apesar da distância, estão sempre presentes.

A todos que de alguma forma contribuíram para a melhoria das condições e organização desse trabalho.

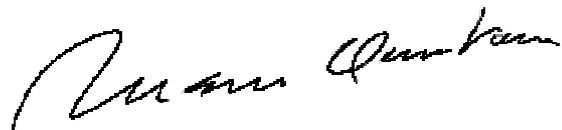
Sentir primeiro, pensar depois  
Perdoar primeiro, julgar depois

Amar primeiro, educar depois  
Esquecer primeiro, aprender depois

Libertar primeiro, ensinar depois  
Alimentar primeiro, cantar depois

Possuir primeiro, contemplar depois  
Agir primeiro, julgar depois

Navegar primeiro, aportar depois  
Viver primeiro, morrer depois

A handwritten signature in black ink, reading 'Mário Quintana'. The signature is fluid and cursive, with the first name 'Mário' being larger and more prominent than the last name 'Quintana'.

Mário Quintana

## ÍNDICE

<b>RESUMO GERAL</b> .....	11
<b>SUMMARY</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	15
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Incidência de resíduos de agentes antimicrobianos em leite: Uma revisão</b> .....	16
Resumo .....	17
Summary .....	18
Introdução .....	19
Enfermidades no gado (Mastite) .....	21
Resíduos de agentes antimicrobianos em leite .....	24
Resistência bacteriana .....	25
Efeitos tóxicos induzidos por agentes antimicrobianos .....	28
Métodos para determinação de resíduos de agentes antimicrobianos no leite .	29
Limite máximo de resíduo .....	31
Conclusão .....	33
Referências Bibliográficas .....	34
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários utilizando análise por injeção em fluxo (FIA)</b> .....	40
Resumo .....	41
Summary .....	41
Introdução .....	42
Material e Métodos .....	44

- <i>Sistema FIA</i> .....	44
- <i>Reagentes</i> .....	45
- <i>Amostras de medicamentos</i> .....	45
- <i>Soluções padrão</i> .....	46
Resultados e Discussão .....	46
Conclusões .....	51
Agradecimentos .....	51
Referências Bibliográficas .....	51

### **CAPÍTULO 3**

<b>Avaliação da estabilidade de tetraciclinas em função do tratamento térmico do leite e do preparo e armazenamento de iogurte</b> .....	54
Resumo.....	55
Summary .....	56
Introdução .....	57
Materiais e Métodos .....	60
- <i>Reagentes e material</i> .....	60
- <i>Soluções</i> .....	60
- <i>Equipamentos e condições de uso do cromatógrafo</i> .....	60
- <i>Preparo da amostra</i> .....	61
- <i>Validação do método</i> .....	61
- <i>Tratamento térmico do leite</i> .....	62
- <i>Processamento do iogurte</i> .....	63
- <i>Preparo do inóculo</i> .....	63
- <i>Preparo do iogurte</i> .....	63
Resultados e Discussão .....	63
- <i>Desenvolvimento do método</i> .....	63
- <i>Validação do método</i> .....	66
- <i>Degradação térmica dos agentes antimicrobianos</i> .....	69
- <i>Estabilidade das tetraciclinas no preparo e armazenamento do iogurte</i> .....	72

Conclusões .....	76
Agradecimentos .....	76
Referências Bibliográficas .....	77

## **CAPÍTULO 4**

<b>Determinação cromatográfica de riboflavina na presença de tetraciclinas em leite integral e desnatado usando detecção de fluorescência</b> .....	81
Resumo .....	82
Summary .....	83
Introdução .....	84
Material e métodos .....	85
- <i>Equipamentos</i> .....	85
- <i>Soluções e reagentes</i> .....	86
- <i>Amostras</i> .....	86
- <i>Análise das amostras</i> .....	86
Resultados e discussão .....	86
- <i>Preparação das amostras</i> .....	86
- <i>Condições cromatográficas</i> .....	87
- <i>Validação</i> .....	87
- <i>Determinação de riboflavina no leite</i> .....	88
- <i>Comparação do método CLAE com o espectrofluorimétrico</i> .....	88
- <i>Interferentes analíticos</i> .....	89
Conclusões .....	89
Agradecimentos .....	89
Referências bibliográficas .....	90
Conclusões gerais .....	94

## TABELAS

### **CAPÍTULO 1- Incidência de resíduos de agentes antimicrobianos em leite: Uma revisão**

Tabela 1- Resíduos de diferentes agentes antimicrobianos em leite bovino, após aplicação intramamária .....	26
Tabela 2- Métodos e limites de detecção de agentes antimicrobianos no leite	32

### **CAPÍTULO 2- Determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários utilizando análise por injeção em fluxo (FIA)**

Tabela 1- Figuras de mérito para validação do método FIA .....	47
--	----

### **CAPÍTULO 3- Avaliação da estabilidade de tetraciclinas em função do tratamento térmico do leite e do preparo e armazenamento de iogurte**

Tabela 1- Condições experimentais utilizadas no preparo e estocagem do iogurte .....	64
Tabela 2- Parâmetros de validação por CLAE para tetraciclinas em leite e iogurte .....	68
Tabela 3- Valores de pH durante o armazenamento do iogurte .....	75

### **CAPÍTULO 4- Determinação cromatográfica de riboflavina na presença de tetraciclinas em leite integral e desnatado usando detecção de fluorescência**

Tabela 1- Parâmetros analíticos para determinação de riboflavina no leite ....	92
Tabela 2- Resultados para determinação de riboflavina no leite .....	92

## FIGURAS

### **CAPÍTULO 2- Determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários utilizando análise por injeção em fluxo (FIA)**

Figura 1-	Fórmula estrutural das tetraciclinas .....	43
Figura 2-	Diagrama esquemático do sistema FIA .....	45
Figura 3-	Espectro de fluorescência molecular bidimensional da oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina .....	48
Figura 4-	Efeito da concentração de NaOH na fluorescência das tetraciclinas .....	49
Figura 5-	Diagrama do padrão de oxitetraciclina .....	50

### **CAPÍTULO 3- Avaliação da estabilidade de tetraciclinas em função do tratamento térmico do leite e do preparo e armazenamento de iogurte**

Figura 1-	Cromatogramas obtidos na determinação de tetraciclinas em leite .....	69
Figura 2-	Cromatogramas obtidos na determinação de tetraciclinas em iogurte .....	70
Figura 3-	Degradação da oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina em função do tratamento térmico do leite .....	71
Figura 4-	Degradação da oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina em função do tempo de aquecimento leite .....	73
Figura 5-	Degradação da oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina durante o processamento e estocagem do iogurte .....	74

### **CAPÍTULO 4- Determinação cromatográfica de riboflavina na presença de tetraciclinas em leite integral e desnatado usando detecção de fluorescência**

Figura 1-	Cromatogramas de padrão de riboflavina e amostra de leite .....	93
Figura 2-	Cromatograma de riboflavina em leite na presença de oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina .....	93

## RESUMO GERAL

Os objetivos do presente estudo foram estabelecer e validar métodos analíticos (utilizando análise por injeção em fluxo - *FIA*, e cromatografia líquida de alta eficiência - *CLAE*), para a determinação de oxitetraciclina (OTC), doxiciclina (DC) e tetraciclina (TC) em medicamentos veterinários e em alimentos (leite e iogurte), assim como avaliar a estabilidade dessas tetraciclinas durante o processamento térmico do leite e durante o processo de fabricação e armazenamento do iogurte. As análises por *FIA* foram desenvolvidas baseadas na emissão de fluorescência das tetraciclinas em meio básico. As análises por *CLAE* foram realizadas utilizando-se uma fase estacionária ( $C_8$  de fase reversa), fase móvel [acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  + EDTA  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  + cloreto de cálcio  $35 \text{ mmol L}^{-1}$ ] : metanol (65:35, v/v) e detector de fluorescência. No processamento térmico do leite foram utilizados três procedimentos distintos de aquecimento (microondas, chapa de aquecimento e fogão). A produção do iogurte foi realizada com leite adicionado de tetraciclinas, para verificar a degradação dos antimicrobianos durante o processamento e vida-de-prateleira do produto. Os parâmetros avaliados para validação foram estabelecidos para cada matriz analisada (leite e iogurte). As análises por *FIA*, apresentaram detectabilidade (120 ng); e a recuperação variou de 98 a 104 % para as três tetraciclinas. Os resultados obtidos indicaram que o método *FIA* proposto é adequado para a determinação do princípio ativo de medicamentos de uso veterinário à base de tetraciclinas. Com relação às análises cromatográficas, as porcentagens de recuperação das tetraciclinas, nas amostras de leite e iogurte foram: 108% para OTC, 87% para DC e 99,8% para TC, com limite de quantificação de 27; 46 e 33  $\text{ng mL}^{-1}$  para OTC, DC e TC respectivamente. No processamento térmico, a maior porcentagem de degradação foi constatada na placa de aquecimento (11; 28 e 15 %) para OTC, DC e TC, respectivamente. Verificou-se que no processamento do iogurte, contaminações com tetraciclinas, acima do limite máximo recomendado (LMR), não foram suficientes para inibir o processo fermentativo, e ao final de 30 dias de armazenamento (sob refrigeração) do iogurte, foram obtidas degradações de 52% (OTC), 61% (DC) e 67% (TC). Visto que na determinação das tetraciclinas no

leite, a presença da riboflavina era evidenciada nos cromatogramas obtidos, foi estabelecido e validado um método analítico simples e rápido para a determinação desse composto, utilizando CLAE. O método desenvolvido para análise de riboflavina, apresentou uma recuperação satisfatória (92%) e limites de detecção e de quantificação ( 0,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), mostrando-se robusto na presença de substâncias fluorescentes como as tetraciclinas.

## SUMMARY

The objectives of the present study were establish and validate analytical methods (using flow injection analysis - FIA and high performance liquid chromatography - HPLC) for the determination of oxitetracycline (OTC), doxycycline (DC) and tetracycline (TC) in veterinarians drugs and foods (milk and yoghurt). As well as evaluating the stability of these tetracyclines during the thermal processing of milk and during the process of manufacture and storage of the yoghurt. The analyses for FIA were developed based on the emission of fluorescence of the tetracyclines in alkaline solution. The analyses for HPLC were carried through using a stationary phase ( $\text{C}_8$  of reverse phase), mobile phase [acetate 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  + EDTA 25 mmol  $\text{L}^{-1}$  + calcium chloride 35 mmol  $\text{L}^{-1}$ ]: methanol (65:35, v/v) and fluorescence detection. In the thermal processing of milk, three distinct procedures of heating were used (microwaves, plate of heating and cooking-stove). The production of the yoghurt was carried through with added milk of tetracyclines, to verify the degradation of antimicrobians during the processing and shelf-life of the product. The parameters evaluated for validation were established for each analyzed matrix (milk and yoghurt). The analyses for FIA showed detectability (120 ng) and the recovery varied of (98 to 104%) for tetracyclines. The results indicated that the FIA method considered is suitable for the determination of tetracyclines in veterinarian formulations. In the chromatographic analyses, the percentage of recovery of the tetracyclines, in the samples of milk and yoghurt was: 108% for OTC, 87% for DC and 99.8% for TC, with limit of quantification of 27; 46 and 33 ng  $\text{mL}^{-1}$  for OTC, DC and TC

respectively. Higher degradation occurs when the heating was conducted in the heating plate (11; 28 and 15%) for OTC, DC and TC, respectively. It was verified that in the processing of the yoghurt, contaminations with tetracyclines, above of the LMR, that it was not enough to inhibit the fermentative process, and to the end of 30 days of storage (under refrigeration) of the yoghurt, the tetracyclines levels were reduced in 52%, 61% and 67%, for OTC, DC and TC, respectively. The method developed for riboflavin analysis, presented a satisfactory recovery (92%) and limits of detection and quantification ( $0.22 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively), showing robustness in the presence of fluorescent substances as the tetracyclines.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

O leite e seus derivados têm uma importante função na alimentação do homem, pois são alimentos de elevada qualidade nutricional, podendo ser considerados como uma das principais fontes de cálcio e proteínas (COSTA, 1996). É um fluido biológico completo, cuja composição e propriedades físicas variam de uma espécie à outra, em função das necessidades dietéticas de quem o consome. O constituinte que está presente em maior quantidade no leite é a água; contendo segundo as espécies, quantidades variadas de lipídios, proteínas e carboidratos que são sintetizados na glândula mamária. Também encontram-se no leite baixos teores de minerais e outros componentes lipo- e hidrossolúveis que são provenientes diretamente do plasma, proteínas do sangue e intermediários da síntese mamária (OLIVEIRA, *et al.*1999).

A ocorrência de resíduos de antimicrobianos, resultante principalmente do tratamento da mastite bovina, é um problema importante para a indústria de laticínios. Para garantir a segurança tecnológica e toxicológica é necessária a aplicação de um sistema integrado de detecção para agentes antimicrobianos. No caso desses resíduos, o controle deve ser rigoroso desde a origem do leite, estabelecendo-se padrões mínimos que garantirão a segurança do consumidor, pois quando se administram doses subclínicas em uma população, as bactérias

começam a produzir enzimas e anticorpos que inativam o agente antimicrobiano, criando resistência (CAMPOS,1997).

A utilização de agentes antimicrobianos em medicina veterinária apresenta aspectos bastante complexos, considerando-se a ampla variedade de espécies e os diversos fins aos quais eles são aplicados. Com relação à variedade de espécies, a indicação dos agentes antimicrobianos está em parte condicionada ao tipo de infecção ou afecção pertinente a cada uma delas. Quanto aos fins aos quais eles são aplicados, além dos objetivos terapêuticos e profiláticos, os antimicrobianos são também empregados em rações com a finalidade de manter o animal saudável e acelerar seu crescimento (GUSTAFSON & BOWEN, 1997).

A monitorização de alimentos contaminados com resíduos de agentes antimicrobianos tem aumentado devido à sua importância na saúde pública, visto que o uso dessas substâncias não permitidas, ou a falta de diretrizes para sua aprovação em produtos, poderá resultar em resíduos com potencial de dano à saúde (MOATS & HARIK-KAHN, 1995; OLIVEIRA, 1999).

Assim, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a presença de tetraciclina [oxitetraciclina (OTC), doxiciclina (DC) e tetraciclina (TC)] em leite e iogurte. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. estabelecimento de método analítico utilizando análise por injeção em fluxo (*FIA*), para a determinação de oxitetraciclina (OTC), doxiciclina (DC) e tetraciclina (TC) em medicamentos veterinários.
2. estabelecimento de método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação de resíduos de tetraciclina (OTC, DC, e TC) no leite e no iogurte;
3. avaliação da estabilidade das tetraciclina (OTC, DC, e TC) durante o processamento térmico do leite.
4. avaliação da estabilidade das tetraciclina durante o processo de fabricação e o armazenamento do iogurte.

Na determinação das tetraciclina no leite, em virtude da presença da riboflavina ser evidenciado nos cromatogramas obtidos, foi estabelecido e validado

um método analítico simples e rápido, utilizando CLAE, para a determinação de riboflavina em leite, na presença de tetraciclinas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, V. Antibióticos no leite é prejuízo certo dentro e fora da fazenda. *Balde Branco*, n 395, p.32-35, 1997.
- COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, v.10, n.44, p.15-17, 1996.
- GUSTAFSON, R.H. & BOWEN, R.E. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, v. 83, n.5, p.531-541, 1997.
- MOATS, W. A. & HARIK-KAHN, R. Rapid HPLC Determination of Tetracycline antibiotics in milk. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. v.43, n.4, p.931-934. 1995.
- OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L. & GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados a produção, que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.13, n.62, p.10-16,1999.

**Este artigo será submetido para publicação no Boletim da SBCTA**

## **CAPÍTULO I - INCIDÊNCIA DE RESÍDUOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM LEITE: UMA REVISÃO**

### **RESUMO**

A importância da ciência e da tecnologia de alimentos na melhoria da qualidade de vida é ressaltada pela vital necessidade de se ter alimentos saudáveis, com elevado valor nutricional, disponíveis e acessíveis à população. Desde o surgimento do ser humano, o leite apresenta-se quase inseparável da sua alimentação. Os avanços nas técnicas relacionadas às etapas de produção, processamento e distribuição do leite têm favorecido ainda mais o seu consumo, particularmente o de origem bovina. Porém, essas etapas induzem à alterações bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas, nutricionais, sensoriais e reológicas, que podem comprometer a qualidade do produto final. A utilização de medicamentos veterinários, para o tratamento de enfermidades nos rebanhos bovinos, tornou-se muito importante no ganho de produção podendo, entretanto, comprometer a qualidade e o desenvolvimento de produtos lácteos. Entretanto, a presença de resíduos desses medicamentos no leite e derivados tem sido uma preocupação constante para a pecuária e fabricação de produtos lácteos. Problemas relacionados à saúde pública também são fatores preocupantes, uma vez que a ingestão de leite com resíduos de agentes antimicrobianos, em particular por pessoas alérgicas, pode levar a reações adversas variando de uma simples erupção cutânea até um choque anafilático. Ainda, em vista dos agentes antimicrobianos presentes nos alimentos serem ingeridos em sub-doses, a população está sujeita a desenvolver resistência bacteriana. Os níveis de tolerância para estes resíduos são estabelecidos por entidades oficiais, quer sejam internacionais, regionais ou nacionais, estabelecendo valores de segurança de uso. Neste trabalho é apresentada uma revisão sobre o assunto, considerando os aspectos de utilização e indicação do uso de agentes antimicrobianos na

pecuária, resíduos nos alimentos, assim como os efeitos tóxicos induzidos por essas substâncias e os limites de resíduos recomendados oficialmente.

Palavras-chave: agentes antimicrobianos, tetraciclina, leite, medicamentos veterinários, mastite.

## **SUMMARY**

The importance of science and food technology in the improvement of the quality of life is due to the vital necessity to have healthy foods, with high nutritional value, available and accessible to the population. Since the origin of the human being, milk has been an integral part of human feeding. Advances in the techniques of milk production, processing and distribution, have favored its consumption even more, particularly that of bovine milk. However, these stages induce biochemical, physicochemical, microbiological, nutritional, sensorial, and rheological alterations, that can compromise the quality of the final product. Veterinary drugs used in the treatment of cattle diseases, can become very important in the quality assurance and production of dairy products. Residues of these drugs in milk have been a constant concern in the manufacture of dairy products. Problems related to public health are an additional concern, since the ingestion of milk containing antimicrobial agent residues in the case of sensitive people, can lead to reactions varying from simple skin eruptions to anaphylactic shock and even if the antimicrobial agents are ingested in low dosage, the population is subject to the development of bacterial resistance. The residue tolerance levels are established by official entities, and integrated into the norms for foods and drugs, aimed at guaranteeing food safety. A revision on the subject is here presented, considering aspects of use and indications for the use of antimicrobial agents in cattle, as well as the incidence of residues and the toxic effect of the presence of these antimicrobials in milk, and the residue limits recommended by official agencies.

Key words: antimicrobials, tetracycline, milk, veterinary drugs, mastitis.

## INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico completo, cuja composição e propriedades físico-químicas variam de uma espécie a outra. A água é o maior constituinte do leite, que também contém lipídeos, proteínas e carboidratos que são sintetizados na glândula mamária. Também encontram-se no leite pequenas quantidades de minerais e outros componentes lipo e hidrossolúveis que são secretados diretamente do plasma sangüíneo, como proteínas sangüíneas e intermediários da síntese mamária. Do ponto de vista de segurança alimentar, o leite ocupa lugar de destaque na alimentação humana, pois constitui-se em um alimento essencial para todas as idades, principalmente recém-nascidos, o mesmo se aplicando para todos os derivados lácteos (OLIVEIRA *et al.*,1999). No entanto, sua composição química pode ser alterada por uma série de fatores, tais como, raça, idade e alimentação do animal, estágios de lactação, variações climáticas, ou ainda infecções do úbere da vaca (OLIVEIRA e CARUSO,1984).

As infecções no úbere, mesmo que sub-clínicas, induzem a diminuição da concentração de gordura, lactose e caseína, e o aumento no conteúdo de proteínas do soro e de cloretos (PELCZAR, *et al.*,1996). Em função dessas infecções, os agentes antimicrobianos têm sido bastante utilizados nas criações de bovinos e até em muitos casos, de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando a cura de mastite, ou ainda incorporados a alimentação animal como suplemento dietético (MINIUSSI, 1992).

Atualmente, os agentes antimicrobianos são uma alternativa terapêutica indispensável na produção de animais, e também são utilizados como aditivos ou promotores de crescimento, sendo incorporados na ração dos animais (GUSTAFSON e BOWEN, 1997). Estes procedimentos podem conduzir à presença de resíduos desses medicamentos, representando um risco à saúde do consumidor sendo, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública (BISHOP e WHITE,1984).

Agentes antimicrobianos têm sido utilizados na pecuária por várias décadas, e são administrados por infusão no úbere da vaca para o tratamento de

mastite, por injeção parenteral (intra-muscular e subcutânea) e intravenosa para o tratamento de diversas doenças, por via oral para o tratamento de enfermidades ou através da dieta terapêutica no aparelho genital, no caso de infecções vaginal, cervical e uterina. Esses usos podem acarretar na contaminação do leite e derivados, utilizados para consumo humano, com resíduos de agentes antimicrobianos, quando o período de carência não é respeitado (BISHOP e WHITE, 1984).

A presença de agentes antimicrobianos no leite, em pequenas quantidades, tem originado problemas na indústria de laticínios, incluindo: (a) coagulação inadequada do leite e maturação imprópria de queijos, durante a manufatura, (b) diminuição da acidez e produção de *flavor* durante a manufatura de manteiga e produtos similares, (c) diminuição do crescimento de fermento láctico e (d) validade de testes de controle de qualidade (MARTH e ELLICKSON, 1959). Estas complicações podem resultar em produtos de qualidade inferior, que devem ser descartados, ocasionando elevado custo na limpeza dos equipamentos e subsequente desperdício de tempo (KATZ, 1982).

No Brasil, o perfil da cadeia produtiva de leite vem sendo alterada acentuadamente ao longo dos últimos 5 anos. A necessidade de profissionalização da produção fez com que programas de controle de mastite, através da contagem de células somáticas (CSS) e da coleta a granel do leite fossem bastante empregados. Por outro lado, a indústria de laticínios, atende a um consumidor cada vez mais exigente em relação às características do produto adquirido (sejam de qualidade ou de segurança/inocuidade), introduzindo-se novas tecnologias de produção, controle de qualidade e dando início à aplicação dos princípios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (FILHO e DIAS, 2001). Segundo dados da EMBRAPA, o consumo *per capita* brasileiro é da ordem de 122,6 litros/habitante/ano (EMBRAPA. CNPGL, 2003).

Este trabalho tem como objetivo apresentar dados sobre incidência de resíduos de agentes antimicrobianos utilizados no rebanho, e seus possíveis efeitos quando não são respeitados os períodos de carência desses medicamentos, os quais podem ser encontrados no leite sob a forma de resíduos.

## **ENFERMIDADE NO GADO (Mastite)**

A mastite ou mastite é uma doença definida como a inflamação da glândula mamária. Caracteriza-se por causar alterações significativas na composição do leite e pelo aumento na concentração de células somáticas (CCS) (GERMANO e GERMANO,1995). Estas células estão presentes normalmente no leite e são constituídas, em sua maioria, por leucócitos, sobretudo neutrófilos, e células de descamação do epitélio secretor da glândula (BIBALKE, 1994; NICKERSON, 1994).

Também dentre as alterações no leite, observa-se um menor teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e aumento de imunoglobulinas, cloretos e lipase, porém esta última torna o leite com sabor rançoso, em função da hidrólise dos ácidos graxos de cadeia curta, enquanto que a ação de enzimas proteolíticas geram um sabor amargo no leite armazenado, e nos seus derivados. Através dessas alterações o leite torna-se inadequado para o consumo e para a produção de derivados (COSTA, 1996; MURPHY,1989; RENEAU e PACKARD,1991).

A mastite caracteriza-se, na fase aguda, por uma diminuição na secreção de leite e o aparecimento de grumos de pus e estrias de sangue no mesmo. Apesar de que a infecção por bactérias ser mais freqüente, ela se dá também por fungos, vírus, algas e outros, que são mais resistentes a tratamentos a base de antibióticos (MONTEIRO e SILVA, 1998).

A mastite tem sido mundialmente considerada a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, devido à elevada prevalência e aos prejuízos econômicos provocados (GERMANO e GERMANO,1995).

Podem ocorrer três tipos de mastites:

1. **mastite subclínica** - não se observa visualmente, embora exista inflamação que pode ser constatada através da análise do leite. Pode trazer sérios problemas porque só é percebida quando se encontra na fase avançada (mastite crônica ou aguda) cujo tratamento muitas vezes é ineficaz. Este tipo de mastite é referida como obscura sendo baseada na estimativa da quantidade de células somáticas;

2. **mastite clínica** - pode ser moderada ou aguda, com a presença de leucócitos no leite;

- **mastite clínica moderada** - envolve anormalidades no leite, como o surgimento de flocos, grumos e um aspecto aguado. Um úbere sensível ou quente pode desaparecer, portanto pode ser sinal de inchaço;
- **mastite clínica aguda** - Caracteriza-se pelo aparecimento repentino, apresentando úbere inflamado, muito sensível e com elevada temperatura. O leite apresenta-se grosso, com pus e grumos amarelados. Não sendo tratada em tempo, a doença pode evoluir provocando abscessos e ruptura da glândula;

3. **mastite crônica** - Caracteriza-se pelo endurecimento da glândula mamária, causando atrofia e inatividade, ocorrendo o endurecimento do úbere; (MONTEIRO, 1998)

Em muitos países, observa-se que mais de cinquenta por cento das vacas apresentam mastite subclínica. Embora a terapia com agentes antimicrobianos não seja suficiente, para alguns tipos de bactérias são amplamente utilizados. O tratamento é recomendado em casos agudos, quando os sintomas de mastite são visíveis, porém em casos subclínicos a terapia da vaca "seca" pode ser iniciada no final do período de lactação (HONKANEN-BUZALSKI e REYBROECK, 1997).

Devido a incidência de mastite bovina, durante a elaboração de queijos semi-duros a diminuição no rendimento industrial é particularmente drástica, podendo alcançar valores de até 4%. Isto significa uma perda final de 400 kg de queijo para cada 100.000 litros de leite processado, se for considerado o rendimento médio de 1 kg de queijo para cada 10 litros de leite utilizado. (BARBANO,1991; POLITTIS, e NGKWAI-HANG,1988). As alterações na vida-de-prateleira (*shelf-life*) ocorrem no leite fluido e em produtos derivados. Este fenômeno deve-se, principalmente, à ação de enzimas proteolíticas, as quais, em grande parte, são termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após os processos usuais de pasteurização do leite (MURPHY,1989; RENEAU e PACKARD, 1991).

As tetraciclinas constituem um amplo grupo de agentes antimicrobianos de largo espectro de ação, dos quais três são obtidos naturalmente por fermentação de determinados fungos e os demais por processo semi-sintético. A primeira

tetraciclina descoberta foi a aureomicina, obtida em 1948, a partir de culturas de *Streptomyces aureofaciens*. O antibiótico recebeu, nessa época, o nome de aureomicina devido à coloração do fungo produtor. São ativas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, riquetsias, micoplasmas, clamídias, borrelíias, actomicetos, legionelas e algumas micobactérias. Hoje em dia a oxitetraciclina é obtida de culturas de bactérias do gênero *Streptomyces*, e a tetraciclina obtida por fermentação ou por processo semi-sintético, a partir da clortetraciclina. Através da oxitetraciclina, são obtidos dois derivados semi-sintéticos, a doxiciclina e a metaciclina (TAVARES, 1996).

Estes agentes antimicrobianos são secretados no leite pelo processo de difusão simples, principalmente os compostos de pronunciada lipossolubilidade. Portanto, em virtude da diferença de pH existente entre plasma e leite, eletrólitos fracos, como as tetraciclina, podem se concentrar mais no leite do que no plasma (MIDIO e MARTINS, 2000). A doxiciclina mantém a atividade terapêutica no organismo humano por tempo prolongado e penetra muito bem nos tecidos, devido à sua capacidade lipofílica (TAVARES,1996; JONAS *et al.*, 1984). Tetraciclina são agentes antimicrobianos bacteriostáticos nas concentrações terapêuticas usuais e, em concentrações elevadas, podem exercer um efeito bactericida. São transportadas para o interior da célula por um mecanismo de transporte ativo dependente de energia (TAVARES, 1996).

Com exceção da doxiciclina e minociclina, as tetraciclina têm elevada afinidade por cátions divalentes e trivalentes, ligando-se e sofrendo quelação com alumínio, cálcio, magnésio e ferro, em medicamentos e alimentos (TAVARES, 1996).

Geralmente, as tetraciclina quando administradas por via intramuscular são bastante irritantes e provocam intensa dor local. Assim, somente algumas preparações de oxitetraciclina para uso veterinário são administradas por esta via. As doses orais terapêuticas não são indicadas para ruminantes e cavalos, devido às possíveis rupturas do rumem e alterações da microflora intestinal, embora as doses sub-terapêuticas sejam bem toleradas. As vias mais apropriadas para bovinos são a intravenosa ou a intramamária (SPINOSA,1999).

COSTA (1996), relata que as tetraciclinas são os agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de mastite, pois atingem uma concentração considerável na glândula mamária, quando administrado pela via parenteral. A oxitetraciclina é a mais recomendada para mastite originada pela *Pasteurella haemolytica* e *Aerobacter aerogenes*. Esses agentes antimicrobianos na dose de 20 mg kg<sup>-1</sup> são capazes de manter uma ótima concentração bactericida durante 3 dias, com um período mínimo de descarte do leite de 4 dias, após a última aplicação. A doxiciclina é mais indicada para mastites mais crônicas, como as causadas por *Nocardia spp.* e *Clamídia*.

Além do uso em medicina humana e veterinária, as tetraciclinas são utilizadas em vários países para promover o crescimento de animais criados para consumo humano, sobretudo as aves. Estas drogas modulam o crescimento bacteriano intestinal, provocando melhor aproveitamento dos alimentos pelos animais (TAVARES, 1996).

## **RESÍDUOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM LEITE**

No momento em que os agentes antimicrobianos entraram para o arsenal de combate à mastite bovina, começaram a surgir problemas ligados à presença desses medicamentos no leite. Foi Hansen, na Dinamarca que, pela primeira vez, observou que o leite de vacas, tratadas com infusões intramamárias de agentes antimicrobianos, assumia comportamento anormal frente aos fermentos lácticos empregados na fabricação de queijos (LACAZ, 1975).

Admitindo-se a veracidade dos estudos sobre mastite no Brasil, que afirmam que entre 40-50% das vacas leiteiras são portadoras de mastite subclínica e que a forma mais eficaz de controle (seja preventiva ou corretiva) é a utilização de agentes antimicrobianos, é de se admitir também que a presença de seus resíduos no leite seja bastante comum, pois envolve fatores humanos, composição do antimicrobiano usado e propensão do animal a produção de leite (FILHO e DIAS, 2001).

Os contaminantes podem chegar ao leite, tanto decorrentes da alimentação do animal como também pela eliminação mamária de certos medicamentos

(VEISSEYRE, 1988). Seja qual for a via de administração do medicamento (intramamária, intramuscular, intrauterina, subcutânea ou oral), os resíduos de agentes antimicrobianos podem contaminar o leite, em virtude de serem absorvidos pela corrente sanguínea (FILHO e DIAS, 2001).

Segundo KATZ e BRADY (1993), o uso de agentes antimicrobianos pode resultar no aparecimento de resíduos em produtos de origem animal, como leite, carne e ovos. Para evitar a presença desses resíduos no leite, é necessário determinar o período de tempo em que o medicamento estará sendo eliminado pelo leite (período de carência), que deve ser indicado na bula, e varia de acordo com o produto utilizado. Geralmente, produtos para vacas em lactação apresentam menor período de carência do que os produtos para vacas "secas", os quais são desenvolvidos para permanecerem por algumas semanas no úbere.

Na Tabela 1 são apresentados dados da dosagem utilizada e dos níveis de resíduos presentes no leite após o período de carência recomendado, quando da aplicação intramamária de agentes antimicrobianos.

DUDRIKOVA, *et al.* (1996), verificaram que resíduos de oxitetraciclina foram maiores no leite de vacas tratadas pela via intramamária, comparado com as vacas que receberam o medicamento pela via intra-muscular. Foi verificado a presença de OTC no leite, nos dois primeiros dias após o tratamento, não tendo sido verificada a presença de resíduos após quatro dias do término da terapia.

## **RESISTÊNCIA BACTERIANA**

O uso de agentes antimicrobianos tem se tornado uma prática comum no tratamento de infecções bacterianas, tanto em seres humanos como em animais. Certos agentes antimicrobianos usados em animais, para o tratamento de enfermidades ou como promotores de crescimento, são também usados para o controle de doenças em medicina humana. Com o aumento na prevalência e distribuição de infecções antibiótico-resistente em hospitais, e na população em geral, a questão do uso de agentes antimicrobianos tem exigido maior atenção. O uso desses medicamentos ocasiona uma seleção de bactérias resistentes, e a extensão do problema emergente depende da duração da exposição e da

concentração do antibiótico (WEY, 1996). Bactérias que antes eram destruídas por ação da penicilina, agora resistem aos mais potentes antibióticos de última geração. Além disso, as bactérias restritas ao ambiente hospitalar agora estão atuando fora de tais ambientes. O problema é considerado muito grave por parte da comunidade científica. Entre as causas desse descontrole, destaca-se o uso indiscriminado de antibióticos.

Tabela 1. Resíduos de diferentes agentes antimicrobianos em leite bovino, após aplicação intramamária.

Nome	Dosagem	Resíduo no leite	Tempo de carência
<b>β-lactâmicos</b>			
Amoxicilina	200 mg	4,8 μg mL <sup>-1</sup>	12 h
	200 mg	0,08 μg mL <sup>-1</sup>	24 h
	200 mg	0,01 μg mL <sup>-1</sup>	36 h
Penicilina	2 x 10 <sup>5</sup> UI	0,007 UI mL <sup>-1</sup>	84 h
	1-2 x 10 <sup>6</sup> UI	5 UI mL <sup>-1</sup>	12 h
Penicilina G	1 x 10 <sup>5</sup> UI	36,75 UI mL <sup>-1</sup>	12 h
Penicilina G	2 x 10 <sup>5</sup> UI	47,50 UI mL <sup>-1</sup>	12 h
<b>Tetraciclinas</b>			
Oxitetraciclina	1500 mg	0,01 μg mL <sup>-1</sup>	224 h
	500 mg	0,2 μg mL <sup>-1</sup>	24 h
	1000 mg	0,3 μg mL <sup>-1</sup>	24 h
	500 mg	4-12 μg mL <sup>-1</sup>	10 h
<b>Sulfonamidas</b>			
Sulfametoxazol T	400 mg	0	48 h
Dapson	2000 mg	0,02 μg mL <sup>-1</sup>	36 h
<b>Cloranfenicol</b>			
Cloranfenicol	1000 mg	0	72-96 h
Cloranfenicol	90 mg kg <sup>-1</sup>	1 mg mL <sup>-1</sup>	12 dias

Fonte: Monograph on residues and contaminants in milk and milk products, 1992.

A utilização desses medicamentos cria bactérias resistentes que levam à necessidade do uso de novos antibióticos (ANVISA, 2003).

Segundo COSTA (1996) e ALBUQUERQUE, *et al.* (1996), a presença desses agentes antimicrobianos no leite pode ocasionar uma série de problemas, como a seleção de cepas bacterianas resistentes. A ingestão de resíduos de agentes antimicrobianos presentes nos alimentos supõe risco à saúde humana, seja exercendo pressão seletiva sobre a flora intestinal, ou favorecendo o crescimento de microorganismos com resistência natural ou adquirida.

O problema crescente de resistência microbiana a agentes antimicrobianos em bactérias patogênicas humanas, tem sido extensivamente discutido por COHEN (1992) e WEY (1996), e esta resistência é principalmente causada pelo uso inadequado e frequentemente indiscriminado de agentes antimicrobianos. Como consequência, tanto medicamentos considerados clássicos no arsenal terapêutico, como aqueles de introdução recente no comércio, vêm se tornando ineficientes. Neste sentido, este quadro tende a se agravar, principalmente nos casos de patógenos, que infectam tanto animais como seres humanos.

Inúmeras bactérias patogênicas foram isoladas por DEAGUAYO, *et al.* (1992), em amostras de leite pasteurizado. Os autores avaliando a ocorrência de resistência à penicilina, polimixina, cloranfenicol, ampicilina, carbenicilina, eritromicina, gentamicina, canamicina e tobramicina, verificaram que o aparecimento de múltipla resistência nessas bactérias foi de 27% em coliformes fecais, 4% em *Salmonella*, e 3% em *S. aureus*.

VASSIL (1999) avaliou a sensibilidade de 320 linhagens de *S. aureus* isoladas de alimentos, inclusive leite, e verificou que 27% das amostras foram resistentes a inúmeros antibióticos, ocorrendo com maior frequência para a penicilina (22,5%) seguida da estreptomicina (14,7%), tetraciclina (7,2%) e ampicilina (6,9%).

As tetraciclinas têm sido extensamente utilizadas em rações de animais para aumentar a taxa de crescimento. Tal prática tem sido largamente criticada, em virtude da disseminação cada vez maior de resistência às tetraciclinas entre bactérias e plamídios. Este uso resultou em infecções resistentes em fazendeiros que estiveram em contato direto com os animais, em pessoas que trabalham em

matadouros e, talvez, na população em geral. Por este motivo, alguns Países (por exemplo: Grã-Bretanha) proíbem o uso das tetraciclina em rações para animais (KATZUNG, 1998).

## **EFEITOS TÓXICOS INDUZIDOS POR AGENTES ANTIMICROBIANOS**

É essencial que o leite e seus derivados que são consumidos, sejam provenientes de animais saudáveis. Os próprios administradores das fazendas tentam reduzir a necessidade do uso dos agentes antimicrobianos de forma periódica. Todavia, são usados para aliviar sintomas, curar doenças e reduzir o sofrimento do animal. O uso de agentes antimicrobianos, como medida preventiva, não é permitido para vacas leiteiras em lactação (BRASIL, 2002). No entanto, o uso sistemático de agentes antimicrobianos em doses subterapêuticas na alimentação dos bovinos tem originado resistência em muitas bactérias patogênicas residentes no intestino, o que constitui um risco para a saúde dos animais, devido a transmissão zoonótica de agentes patogênicos. A ingestão de agentes antimicrobianos por estes animais pode, ainda, reduzir o número de bactérias benéficas no tubo digestivo e, portanto, levar à alteração da barreira protetora intestinal (THAL, *et al.*1995 e McKELLAR, 1998). Nos bezerros, os agentes antimicrobianos podem ainda provocar mal absorção, devido à sua ação direta sobre a mucosa intestinal. Assim, esses animais podem apresentar diarreia e diminuição do crescimento (SELIM e CULLOR, 1997).

Um dos mais importantes efeitos adversos relacionados aos resíduos de agentes antimicrobianos é a alergia. Muitos medicamentos veterinários induzem reações tipo alérgicas e a maioria dos dados disponíveis estão relacionados a hipersensibilidade a penicilinas, aminoglicosídeos e tetraciclina (KATZ, 1993).

A maioria dos antibióticos administrados em mulheres durante a lactação podem ser detectados no leite materno. As concentrações de tetraciclina no leite correspondem a cerca de 70% das concentrações séricas maternas, estando associadas a um risco de pigmentação dos dentes do lactente. Foi verificado que, nos níveis de usos terapêuticos, as concentrações de cloranfenicol no leite materno não são suficientes para provocar a síndrome do bebê cinzento, embora

haja uma remota possibilidade de provocar mielossupressão. Assim, recomenda-se que antimicrobianos sejam evitados durante a lactação ( KATZUNG, 1998).

Merece especial atenção a impregnação dos dentes de leite, pelas tetraciclina, causando com grande freqüência manchas amareladas ou castanhas, assim como a pigmentação definitiva nos dentes permanentes. Se as doses forem elevadas, ou administradas por muito tempo, pode se observar hipoplasia do esmalte com predisposição às cáries (FONSECA, 1984).

Resíduos de agentes antimicrobianos, de amplo espectro, têm sido encontrados com muita freqüência em diferentes alimentos de origem animal. O leite parece ser o único alimento no qual tais resíduos têm causado reações alérgicas a indivíduos previamente sensibilizados imunologicamente. Reações tóxicas não foram detectadas em indivíduos consumidores de outros tipos de alimentos contaminados com resíduos de antibióticos, apesar de que o desenvolvimento de resistência a esses compostos por bactérias patogênicas, tanto para o homem como para o animal, já ter sido observada (MIDIO e MARTINS, 2000).

## **MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NO LEITE**

O uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos e o desrespeito ao período de carência indicado após a última aplicação do medicamento no animal para utilização do leite para consumo, há décadas têm sido relatados em diferentes pesquisas (KOSIKOWSKI, 1960 e FAGUNDES, 1981).

Dentre os diversos métodos disponíveis no mercado, duas categorias principais devem ser consideradas:

- **métodos microbiológicos:** são testes que utilizam uma cultura bacteriana sensível a antibióticos (*B. stearothermophilus*, *S. thermophilus*, *B. subtilis*, cultura de iogurte), com respostas entre 2:30 h e 8 h, dependendo da cultura utilizada.
- **métodos rápidos:** normalmente específicos, podendo ser enzimáticos, por método ELISA, por cromatografia, dentre outros.

Os testes microbiológicos utilizados (exceto para *B. stearothermophilus*) são normalmente menos sensíveis do que a maioria dos testes rápidos e não atendem às exigências das legislações sobre alimentos, que se baseiam em limites máximos de resíduos (LMR - Europa) ou níveis de segurança (Safe Level - EUA) (FILHO e DIAS, 2001).

A quantificação de resíduos de agentes antimicrobianos envolve a determinação de concentrações muito pequenas, na ordem de  $\text{mg kg}^{-1}$  ou  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; e isto dificulta os procedimentos analíticos, principalmente em amostras complexas como alimentos, fazendo com que a utilização de técnicas cromatográficas sejam, na maioria dos vezes, imprescindível. Por isso, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um grande auxílio, permitindo a separação e a detecção destes compostos. Devido às baixas concentrações a serem determinadas, em alguns casos, há a necessidade de se concentrar os extratos obtidos para viabilizar a detecção cromatográfica. Deste modo, concentram-se também os interferentes analíticos co-extraídos. Isto faz com que sejam necessários passos de clarificação destes extratos, que geralmente são realizados por partição entre o solvente ou mesmo pela utilização de cromatografia preparativa (MOATS e HARIKKAHN, 1995).

Em princípio, a melhor forma para monitorizar a presença de agentes antimicrobianos no leite, seria usar um método de triagem para detecção destes compostos, e numa segunda fase, um método de confirmação para identificar e quantificar os compostos detectados (SENYK, 1990). Atualmente existem vários testes disponíveis comercialmente para a detecção de resíduos de antibióticos em leite. Estes testes variam em relação à classe de antibiótico detectável, sensibilidade e tempo de detecção (SENYK, *et al.* 1990).

Devemos considerar que o resultado de um método microbiano para detecção de resíduos de antibióticos em alimentos, depende da sensibilidade da cepa microbiana e do fato que os resíduos nos alimentos estarem parcialmente livres ou complexados à fração protéica, e que somente a fração não ligada poderá inibir os microorganismos. Para alguns grupos de agentes antimicrobianos, tais como sulfonamidas e tetraciclina, a fração ligada à proteína é tão significativa que uma alta taxa de resultados falsos negativos poderão ocorrer em baixas

concentrações, ou em concentrações próximas ao limite máximo recomendado (AURELI, *et al.* 1999).

Podemos fazer uma comparação, com relação à sensibilidade dos métodos de detecção de resíduos de drogas veterinárias em leite e verificar quais seriam mais adequados para realização dos testes requeridos. Na Tabela 2 está apresentado uma revisão dos princípios dos métodos e limites de detecção para antibióticos em leite

## **LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO**

A garantia da inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertadas ao consumidor é possibilitada pelo controle de resíduos biológicos, decorrentes do emprego de drogas veterinárias, agroquímicos e contaminantes ambientais. É importante destacar que nem todos os medicamentos e compostos químicos, a que os animais ficam expostos, deixam resíduos perigosos à saúde humana e animal e, mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição quando ultrapassam o umbral de concentração conhecido como limite de tolerância, limite de segurança ou limite máximo de resíduo (LMR) que o alimento pode conter, sem prejuízo à saúde dos seres humanos e animais. Estes limites são determinados em centros de comprovada idoneidade científica, a partir de apurados estudos toxicológicos de curto, médio e longo prazo, realizados por renomados pesquisadores, em animais de laboratórios e microorganismos. Após a conclusão destes estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, avaliam os resultados e, posteriormente, recomendam os LMR's dos diferentes compostos aprovados, à consideração dos Países membros do Codex Alimentarius - Programa das Nações Unidas sobre Harmonização de Normas Alimentares, gerenciado pela FAO/WHO (Monograph on residues and contaminants in milk and milk products, 1991).

O termo LMR pode ser definido como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um contaminante, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é permitido ou reconhecido como aceitável no alimento.

O LMR leva em consideração a ingestão diária aceitável (IDA) para cada composto (MITCHELL, *et al.*1998) (ANVISA, 2003).

Tabela 2. Métodos de análise e limites de detecção de agentes antimicrobianos em leite.

<b>AGENTES ANTIMICROBIANOS</b>	<b>PRINCÍPIO DE DETECÇÃO</b>	<b>LIMITE DE DETECÇÃO (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
Amoxicilina	CLAE	0,01
Ampicilina	CLAE	0,002
Cloranfenicol*	CLAE	0,001
	CG	0,0001
	CCD	0,0001
	Lac Tek	< 0,005
Clorotetraciclina	CLAE	0,015
	Lac Tek TC	0,10
Cloxacilina	CLAE	0,01
	CCD	0,004
Oxitetraciclina	CLAE	0,015
	Lac Tek TC	0,030
Penicilina	CLAE	0,005
	Ensaio radioativo	0,00002
Penicilina G	CCD	0,004
	CLAE	0,005
Sulfadiazina	CLAE	0,005
Sulfametoxina	CLAE	0,005
	ELISA	0,010
Sulfametazina	CLAE	0,005
	ELISA	0,010
Sulfatiazole	CLAE	0,005
Doxiciclina	CLAE	*
Tetraciclina	CLAE	0,005
	Lac Tek TC	0,05

\* nenhum nível de tolerância e segurança foi estabelecido pelo FDA

Fonte: Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products, (1991).

De acordo com avaliação realizada pelo FDA *Center for Veterinary Medicine* (CVM) foi estabelecido que o valor de IDA para resíduos totais de tetraciclina, incluindo oxitetraciclina, clortetraciclina e tetraciclina, deve ser  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corpóreo. Com base nesta avaliação, o limite de tolerância de 100 ppb foi estabelecido para a soma de resíduos das três tetraciclina (oxitetraciclina, clortetraciclina e tetraciclina) no leite (FDA, 2000).

A competência para estabelecer os limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos em alimentos, no Brasil, é do Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). Para medicamentos veterinários está sendo utilizado o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB, 1999), Instrução Normativa / MAA n° 42, de 20/12/1999, instituído pelo Ministério da Agricultura, com o objetivo de sistematizar os meios de controle de contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária (BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2000), juntamente com a Portaria n° 78 de 19 de dezembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Este programa especifica o medicamento, matriz, método de análise, LQ, número de amostras, laboratório onde foram realizadas as análises e LMR estabelecido para agentes antimicrobianos, em leite, o mesmo valor atribuído pela legislação internacional. Ainda não foi estabelecido valor de LMR para a doxiciclina, apesar de haver medicamentos sendo comercializados para o tratamento de mastite bovina, contendo este princípio ativo (SINDAN, 2002).

## **CONCLUSÕES**

O uso indevido de medicamentos veterinários, especialmente nos países onde seu emprego não é controlado rigorosamente, poderia ser corrigido através de informações suficientes e exatas aos produtores, veiculadas por cooperativas e centros governamentais de apoio técnico. A difusão de boas práticas veterinárias e agrícolas levaria a uma redução dos níveis destas substâncias, deixando de ser

motivo de preocupação pública. Assim, as questões que envolvem a melhoria da qualidade do leite ao nível da produção, são extremamente complexas e requerem o esforço conjunto de todos os setores envolvidos. Em muitos países os medicamentos veterinários são oficialmente registrados ou aprovados e os períodos de carência são fixados, com relação à ordenha. Mantendo-se a garantia de que este período será respeitado, haverá maior segurança para os consumidores de leite e derivados e diminuição de perdas econômicas para o pecuarista.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet. Brasília, Novembro de 2003. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf)> Acesso em 27/08/2004.
2. ALBUQUERQUE, L.M.B., MELO, V.M.M. & MARTINS, S.C.S. Investigação sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE-Brasil. *Higiene Alimentar*, v.10, n.41, p.29-32, 1996.
3. AURELI, P., FERRINI, A.M., MANNONI, V. Effect of some proteolytic enzymes on microbial detection levels for tetracyclines and sulfonamides in milk serum. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, v.50, n.415, p.115-118, 1999.
4. BARBANO, D.M., RASMUSSEN, R.R., LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.2, p.369-388, 1991.
5. BIBALKE, D. The effect of high somatic cell count on the quality of dairy products. *Dairy Food Sanitation*, v.4, n.15, p.67-68. 1994.
6. BISHOP, J.R. & WHITE, C.H. Antibiotic residue detection in milk: A review. *Journal of Food Protection*, v.47, n.8, p.647-652, 1984.

7. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria N° 78, de 19 de dezembro de 2002. Anexo III. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de janeiro de 2003, seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrolegis/do/ConsultaLei?op=viewTextual&código=1085>>. Acesso em: 11/03/2004.
8. COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. *Science*, v.257, n.5073, p.1050-1055, 1992.
9. COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, v.10, n.44, p.15-17, 1996.
10. DEAGUAYO, M.E.D., DUARTE, A.B.L. & CANASTILLO, F.M.D. Incidence of multiple antibiotic-resistance organisms isolated from retail milk-products in Hermosillo. *Journal Food Protection*, v.55, n.5. P.370-373, 1992.
11. DUDRIKOVA, E., SOKOL, J., BURDOVA, O., TUREK, P., CABADAJ, R. Excretion of oxytetracycline residues by milk of cows with clinical mastitis during lactation period. *Veterinarni Medicina*, v.41, n.11, p.329-333, 1996.
12. EMBRAPA. CNPGL. Produção, importação, exportação e consumo de leite no Brasil, 1980 – 2003. Tabela 07.06. Disponível em: <<http://www.Cnpgl.embrapa.br/producao/07consumo/tabela07.06.php>> Acesso em 27/08/2004
13. FAGUNDES, C.M. Persistência de antibiótico no leite bovino e em condições experimentais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.36, n.216, p.27-30, 1981.
14. FDA. United States/Food and Drug Administration. Tolerances established for tetracycline in milk. Disponível em <[www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)>. Acesso em 03/06/2000.
15. FILHO, J.F. & DIAS, J.G. Antibióticos no leite: problemas e conseqüências. Artigo técnico. *Qualidade em Dia*. Hexis Científica. v.16, p.6-7, 2001.
16. GERMANO, P.M.L. & GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: Aspectos gerais das mastites. *Higiene Alimentar*, v.9, n.36, p.12-16, 1995.

17. GUSTAFSON, R.H. & BOWEN, R.E. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, v.83, n.5, p.531-541, 1997.
18. HONKANEN-BUZALSKI, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: International Dairy Federation. *Monography on residues and contaminants in milk and milk products*. Brussels: IDF(International Dairy Federation, Special Issue 9701) p.26-34, 1997.
19. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 50<sup>th</sup> Meeting, Rome, 17-26 february, 1998. <[www.who.int/pes/jecefa/summary\\_50.htm](http://www.who.int/pes/jecefa/summary_50.htm)>. Acesso em 13/02/2003.
20. JONAS, M., COMER, J.B. & CUNHA, B.A. Tetracyclines. In: *Antimicrobial Therapy*. Ed. A.M. Ristuccia and B.A. Cunha. New York, p.219-231, 1984.
21. KATZ, S.E. & BRADY, M.S. In: *Antibiotic residues in food and their significance*. DAVIDSON, P.M. & BRANEN, A.L. *Antimicrobials in Foods*. 2. ed. Revised and expanded. New York, 1993.
22. KATZUNG, B.G. In: *Farmacologia Básica e Clínica*. 6 ed. Guanabara Koogan, Copyright, 1998.
23. KOSIKOWSKI, F.V. The control of antibiotic in milk through a sound test program. *Journal of Milk and Food Technology*, v.23, n.7, p.285-287, 1960.
24. LACAZ, C.S. In: *Antimicrobianos*. 3. ed. São Paulo, Edgard Blucher, Ed. da Universidade de São Paulo, 509 p. 1975.
25. McKELLAR, Q.A. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. *British Medical Journal*. v.317, n.7159, p.610-611, 1998.
26. MARTH, E.H. & ELLICKSON, B.E. Antibiotics residues in milk products - A review. *Journal of Milk Food Technology*. v.22, n.7, p.241-249, 1959.
27. MIDIO, A.F. & MARTINS, D.I. In: *Toxicologia de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela. 295p. 2000.
28. MINIUSSI, J.T. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. In: CHARLES, T.P., FURLONG, J. (Ed.) *Doenças dos bovinos de leite adultos*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p.169-174, 1992.

29. MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W., McEWENS, S.A, McNAB, W.B., YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *Journal of Food Protection*, v.61, n.6, p.742-756, 1998.
30. MOATS, W. A. & HARIKKAHN, R. Rapid HPLC Determination of Tetracycline antibiotics in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.43, n.4, p.931-934, 1995.
31. Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. International Dairy Federation special Issue 9101. IDF General secretariat: 41, Square Vergote, B-1040 Brussels (Belgium), 189 p, 1991.
32. Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. *International Dairy Federation Special Issue 9701*. IDF General Secretariat: 41, Square Vergote, B-1030 Brussels (Belgium), 132 p, 1992.
33. MONTEIRO, R.A.B. & SILVA, K.Q. PDPL-RV. Journal da produção de leite, convênio Nestlé / Funarbe / UFV. Ano X, n.112, Jun 1998. <[www.ufv.br/PDPL/JPL0698C.htm](http://www.ufv.br/PDPL/JPL0698C.htm)>. Acesso em 05/06/2001.
34. MURPHY, S.C., CRANKER, K., SENYK, G.F., BARBANO, D.M., SAEMAN, A.J., GALTON, D.M. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.3, p.620-626, 1989.
35. NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis - Review. *Agri-Practice*, v.15, n.6, p.11-18, 1994.
36. OLIVEIRA, A.J. & CARUSO, J.G.B. Leite: Características, composição química, propriedades, obtenção higiênica, conservação e tratamento. In: CAMARGO, R., FONSECA, H., GONZAGA, F., ANDRADE, M.O., CANTARELLI, P.R., OLIVEIRA, A.J., GRANER, M., CARUSO, J.G.B., LIMA, U.A., MOREIRA, L.S. *Tecnología dos produtos agropecuários*. São Paulo: NOBEL, 1<sup>a</sup> ed., p.191-203, 1984.

37. OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L. & GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.13, n.62, p.10-16, 1999.
38. PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. in: *Microbiology: Concepts and Applications*. New York: McGraw-Hill, v.2, p.22-40, 1993.
39. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 3 (22/01/1999). Diário Oficial n.244 de 22/12/1999, seção 1.
40. POLITIS, I. & NG-KWAI-HANG, K.F. Effect of somatic cell count and milk composition on cheese: composition and cheese making efficiency. *Journal of Dairy Science*, v.71, n.7, p.1711-1719, 1988.
41. RENEAU, J.K. & PACKARD, V.S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.11, n.5, p.4-11, 1991.
42. SELIM, S.A. & CULLOR, J.S. Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.211, n.8, p.1029-1035, 1997.
43. SENYK, G.F., DAVIDSON, J.H., BROW, J.M., HALLSTEAD, E.R., & SHERBON, J.W. Compararison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. *Journal of Food Protection*. v.53, n.2, p.158-164, 1990.
44. SINDAN. Manual de Produtos Veterinários. Sindicato Nacional das Industrias de Produtos para a Saúde Animal. CD-ROM. MPV 2001-2002.
45. SPINOSA, H.S. Considerações gerais sobre antimicrobianos. In: GORNIK, S.L. & BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*, 2 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.333-336, 1999.
46. TAVARES, W. In: *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. Agentes infecciosos*. 2 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.

47. Tetracycline antibiotics, Copyright, Purdue Research Foudation, 1996.  
Disponível em: <[www.vet.purdue.edu/depts/bms/courses/bms514/chmrx/tetrahd.htm](http://www.vet.purdue.edu/depts/bms/courses/bms514/chmrx/tetrahd.htm)>. Acesso em 18/01/2003.
48. THAL, L.A., CHOW, J.W., MAHAYNI, R., BONILLA, H.,PERRI, M.B., DONABEDIAN, S.A., SILVERMAN, J., TABER, S. & ZERVOS, M.J. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, n.9, p.2112-2115, 1995.
49. VASSIL,M. Resistance to antibiotics in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cow mastits, milk, udder smears and milking installation. *Veterinary Medicine*, v.44, n.4, p.115-120, 1999.
50. VEISSEYRE, R. Alteraciones, defectos y contaminaciones de la leche. *In: Lactologia Técnica - Composición, Recogida Tratamento y Transformación de la Leche*. Ed. Acribia, p.76-86, 1988.
51. WEY, S.B. Bactérias multi-resistentes: podemos minimizar esta problema? Anais do 1º encontro de doenças infecciosas adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. *Arquivos Brasileiro de Medicina*, Rio de Janeiro, v.70, n.2, p.97-110, 1996.

**Este artigo foi submetido para publicação na Revista Brasileira de  
Toxicologia**

## **CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS UTILIZANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)**

### **RESUMO**

Foi desenvolvido um método de análise por injeção em fluxo (FIA) com detector de fluorescência para determinação de oxitetraciclina (OTC), doxiciclina (DC) e tetraciclina (TC) em medicamentos veterinários. O sistema FIA foi otimizado com relação ao carregador ( $\text{NaOH } 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e vazão ( $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ). Os comprimentos de onda de excitação e emissão do detector foram 420 e 530 nm, respectivamente. O método foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear (0,02 a  $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ ), linearidade  $r(\text{OTC})$  0,9975;  $r(\text{DC})$  0,9903; e  $r(\text{TC})$  0,9913; precisão intra- e inter-ensaio ( $\text{RSD} < 1,0\%$  e  $< 3,0\%$ , respectivamente), detectabilidade (120 ng), exatidão (98 a 104%) e frequência de amostragem ( $50 \text{ injeções h}^{-1}$ ). Na determinação de tetraciclina em preparações farmacêuticas, disponíveis no comércio, foi verificada variação de 90 a 104%, na quantidade nominal de princípio ativo presente no medicamento.

Palavras-chave: tetraciclina, injeção em fluxo, medicamentos veterinários.

### **SUMMARY**

Flow injection analysis (FIA) coupled to fluorescence detection was employed for the determination of oxytetracycline (OTC), doxycycline (DC) and tetracycline (TC) in veterinary drugs. The FIA system was optimized with respect to the carrier solvent ( $\text{NaOH } 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) and pump flow ( $0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ). The detector excitation and emission wavelengths were set at 420 nm and 530 nm, respectively. The method was validated by the evaluation of the following

parameters: linear range (0.02 - 0.15 mg mL<sup>-1</sup>), linearity: r(OTC) 0.9975; r(DC) 0.9903; and r(TC) 0.9913; intra- and inter-assay accuracy (RSD < 1.0% and < 3.0%, respectively), detectability (120 ng), recovery (98 to 104%) and sampling frequency (50 injections h<sup>-1</sup>). A variation from 90 to 104% in the active ingredient was found, as compared to the nominal amount informed on the label of the veterinary drugs available on the market.

Keywords: tetracyclines, flow injection analysis, veterinary drugs.

## INTRODUÇÃO

Agentes antimicrobianos, em medicina veterinária, podem ser utilizados tanto para tratamento de enfermidades de diferentes espécies animais, como profilático na prevenção de doenças ou, ainda, como promotores de crescimento para melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (ANADÓN & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999, MOATS & HARIK-KAHN, 1995; OLIVEIRA e col.,1999).

Os agentes antimicrobianos são administrados aos animais por diferentes vias e, teoricamente, independente da via a ser utilizada, não se descarta a existência de resíduos de agentes antimicrobianos nos diferentes produtos originários destes animais destinados ao consumo humano. Há indícios de que estes resíduos existentes nestes derivados contribuam para induzir resistência bacteriana, ou mesmo acarretem a transferência de bactérias resistentes dos animais para os seres humanos (MITCHELL e col., 1998).

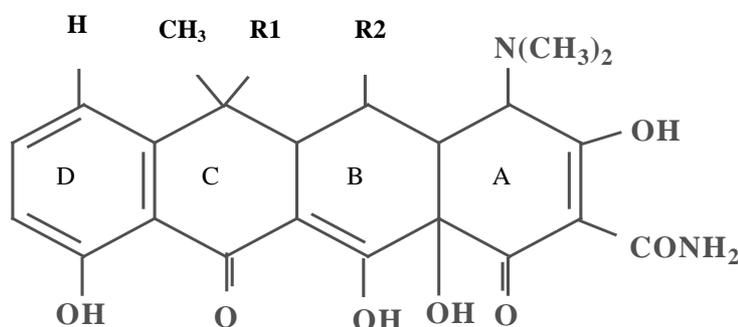
Entre os medicamentos amplamente empregados na medicina veterinária, em particular no tratamento de mastite bovina, destacam-se as tetraciclina. Esses agentes antimicrobianos são bacteriostáticos, porém, dependendo da dosagem e do tempo de permanência no animal, podem exercer ação bactericida (COSTA, 1999).

As tetraciclina possuem em sua estrutura química um grande número de grupos funcionais (Figura 1) e, em solução, formam complexos metálicos na presença de metais como Mg(II), Al(III), Fe(II), Ca(II) e outros.

Diversas metodologias analíticas têm sido empregadas para a determinação de tetraciclinas, dentre essas a espectrofotometria (ALWARTHAN e *col.*, 1991), cromatografia a líquido de alta eficiência (PENA e *col.*, 1997), bioensaios (POIGER e SCHLATTER, 1976; KARLICEK e SOLICH, 1994) e a análise por injeção em fluxo (FIA) (KARLICEK e SOLICH, 1994).

O sistema FIA foi introduzido por Ruzicka e Hansen em 1975 (RUZICKA e HANSEN, 1975 e 1978), e consiste na introdução de um volume discreto e reprodutível de uma amostra em fluido carregador não segmentado que continuamente vai sendo transportada até um detector.

Atualmente os sistemas FIA têm sido largamente empregados para a mecanização/automação de análises químicas, reduzindo custos, tempo de análise e manipulação de amostras, menor risco de contaminação e perdas, além do uso de menores quantidades de solventes orgânicos no laboratório, sendo este último de extrema importância devido à rigidez das leis atuais de proteção ambiental (FACCHINI e PASQUINI, 1998).



Composto	R1	R2
Oxitetraciclina	OH	OH
Doxiciclina	H	OH
Tetraciclina	OH	H

Figura 1. Fórmula estrutural das tetraciclinas (NAKAZAWA e *col.*, 1999).

KARLICEK e SOLICH, 1994, descreveram um método FIA para a determinação de doxiciclina, oxitetraciclina, rolitetraciclina e tetraciclina, baseado na detecção espectrofotométrica, em 520 nm, dos compostos formados na reação das tetraciclinas com 4-aminofenazona e hexacianoferrato.

ALWARTHAN e *col.*, 1991, empregaram o FIA para determinação de oxitetraciclina em formulações farmacêuticas, mediante reação desta com Fe(III) em meio de ácido sulfúrico e detecção espectrofotométrica em 435 nm.

A análise por injeção em fluxo também tem sido empregada para a determinação de antimicrobianos das classes das cefalosporinas (AL-MOMANI, 2001), beta-lactâmicos (ROBARDS e WORSFOLD, 1992; KUBO e SAITOH, 1999), sulfonamidas (MAHEDERO e AARON, (1992), fluoroquinolonas (SULTAN e SULIMAN, 1993), entre outros, em formulações farmacêuticas, apresentando resultados satisfatórios quando comparados com os métodos oficiais de análise descritos nas farmacopéias.

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método simples de análise por injeção em fluxo (FIA), com detector de fluorescência para a determinação de oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina em medicamentos de uso veterinário.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Sistema FIA*

O sistema FIA foi constituído por uma bomba de alta pressão Waters®, modelo 510, injetor manual Rheodyne, alça de amostragem de 20 µL, detector de fluorescência Shimadzu®, modelo RF-10A (sensibilidade = 2 e ganho = 1), com especificação da cela (12 µL de volume) e integrador Chromjet® (Figura 2). As condições otimizadas para o sistema foram: carregador NaOH  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , vazão  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ , bobina de reação  $0,062 \times 120 \text{ cm}$  (diâmetro interno vs. comprimento), e comprimentos de onda de excitação e emissão de 420 e 530 nm, respectivamente. O sinal analítico avaliado foi a altura (cm) dos picos registrados nos diagramas. Para determinar os comprimentos de onda de excitação e emissão

foram registrados espectros de fluorescência molecular bidimensional em fluorímetro Perkin Elmer®, modelo LS 55.

### *Reagentes*

O hidróxido de sódio utilizado foi da marca Reagen®, sendo que as soluções preparadas, foram previamente filtradas em membrana Millipore® (0,45  $\mu\text{m}$ ) e desgaseificadas em banho de ultra-som, anterior a utilização do sistema FIA.

A água utilizada no preparo de todas as soluções foi destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore®).

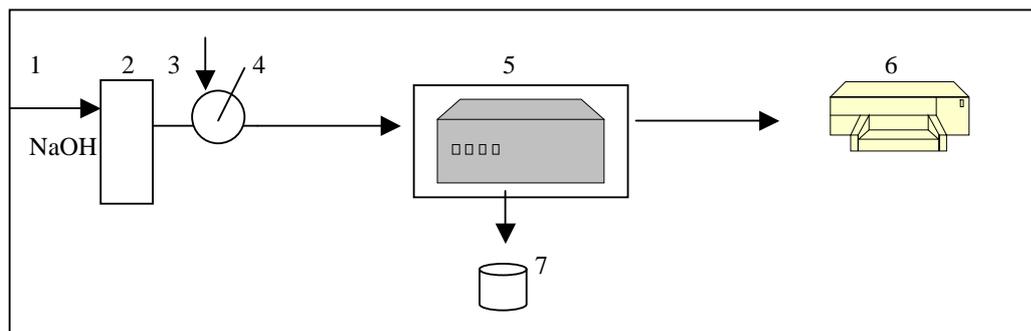


Figura 2. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de tetracilinas. Legenda: 1-Bomba de alta pressão; 2- injeção de padrão e amostra; 3- válvula de injeção; 4- percurso analítico; 5- detector de fluorescência; 6- integrador; 7- descarte.

### *Amostras de medicamentos*

Foram analisadas duas formulações injetáveis à base de oxitetraciclina (20 g/100 mL de veículo q.s.p) e tetraciclina (2 g/20 mL de diluente) e uma formulação oral, à base de doxiciclina (10 g/100 g de excipiente), obtidas no comércio da cidade de Campinas/SP.

Os medicamentos à base de tetracilinas, foram diluídos com água para uma concentração de  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ , anterior à análise pelo sistema FIA.

### *Soluções padrão*

Para o preparo de soluções padrão estoque, nas concentrações de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, foram utilizados padrões analíticos de oxitetraciclina diidrato (Laboratório Inc. Biomedicals Inc®), cloridrato de doxiciclina e cloridrato de tetraciclina (Sigma®) dissolvidos em HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>. A solução estoque foi armazenada sob refrigeração, sendo utilizada por um período máximo de 30 dias.

As soluções de trabalho de 0,02 a 0,15 mg mL<sup>-1</sup>, de cada tetraciclina, foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque com volume apropriado de água.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O método FIA desenvolvido foi baseado na emissão de fluorescência das tetraciclinas em meio básico. Para tanto, foi empregado o sistema apresentado na Figura 2, onde os módulos (bomba, injetor e detector de fluorescência) eram provenientes de um cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

As tetraciclinas exibiram fluorescência em solução alcalina, apresentando intensidade máxima entre pH 10 e 11. Assim, para determinar os comprimentos máximos de onda de excitação e emissão foram registrados espectros de fluorescência molecular bidimensional da OTC, DC e TC em NaOH (Figura 3). Os valores obtidos foram: OTC ( $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ ); DC ( $\lambda_{\text{ex}} = 425 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ ) e TC ( $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ ). Assim, na realização do trabalho no sistema FIA, foram adotados os seguintes valores:  $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ . Segundo PENA *et al.* 1997, a absorção acima de 300 nm está associada ao grupo fenólico- $\beta$ -dicetona podendo, deste modo, o fluoróforo ser atribuído a este grupo e, em solução alcalina, a espécie fluorescente é a sua forma ionizada.

A otimização do sistema FIA foi feita mediante avaliação do efeito da concentração de hidróxido de sódio e da vazão do carregador sobre o sinal analítico. A concentração de cada tetraciclina, utilizada para a otimização do sistema, foi de 0,10 mg mL<sup>-1</sup>. No intervalo de concentração de NaOH de  $1,2 \cdot 10^{-3}$  a  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , verificou-se a ocorrência de um aumento do sinal em 530 nm em função do aumento da concentração de base, independente da concentração,

para concentrações de NaOH maiores do que  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 4). A vazão do carregador foi avaliada no intervalo de 0,5 a 2,0  $\text{mL min}^{-1}$ , sendo que o maior sinal analítico foi registrado com a menor vazão. Portanto, uma vazão de 0,5  $\text{mL min}^{-1}$  foi empregada para os estudos posteriores.

Após otimização dos parâmetros referentes ao sistema FIA, o método foi validado para a determinação dos princípios ativos em formulações de medicamentos veterinários, mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão, em base a recomendações da ANVISA (ANVISA, 2003) e da International Conference on Harmonization (ICH, 1995). As três primeiras figuras de mérito foram obtidas a partir de curvas analíticas externas e estão apresentadas na Tabela 1

Tabela 1. Figuras de mérito para validação do método FIA.

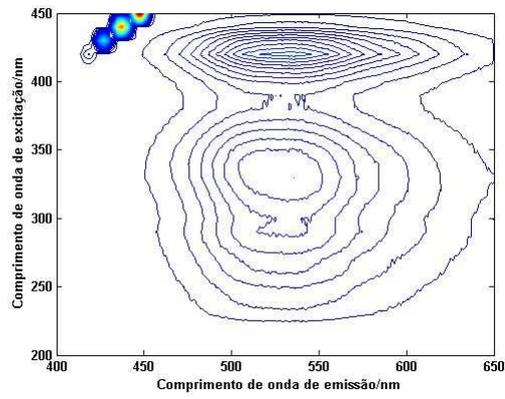
Princípio ativo	Faixa linear ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Sensibilidade ( $\text{cm mL mg}^{-1}$ )	Linearidade*
Oxitetraciclina	0,02 a 0,15	37,0	0,9975
Doxiciclina	0,02 a 0,15	23,9	0,9903
Tetraciclina	0,02 a 0,15	23,7	0,9913

\* A linearidade é expressa como o coeficiente de correlação linear (r).

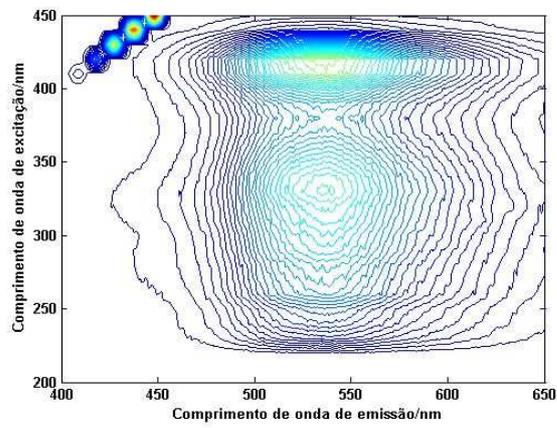
A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detector varia em função da concentração do analito e pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante.

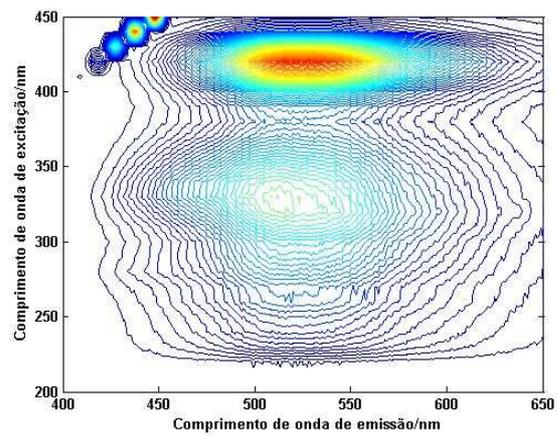
A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais às concentrações do analito, dentro da faixa linear da curva analítica. O coeficiente de correlação foi utilizado para avaliar a linearidade da curva analítica, tendo apresentado valores de 0,9975; 0,9903 e 0,9913 para OTC, DC e TC, respectivamente.



(A)



(B)



(C)

Figura 3: Espectro de fluorescência molecular bidimensional de: (A) oxitetraciclina; (B) doxiciclina e (C) tetraciclina

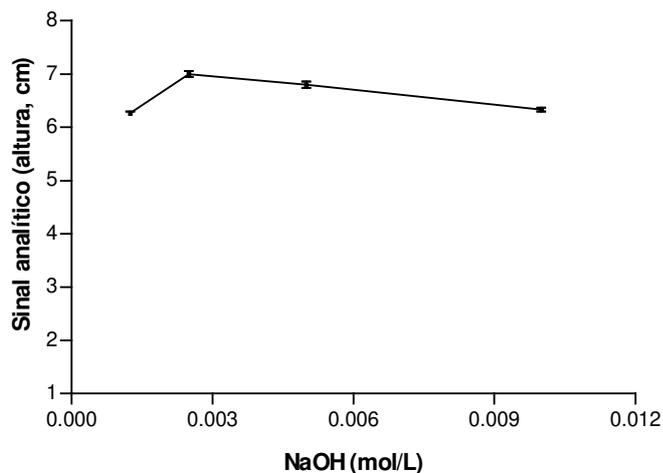


Figura 4. Efeito da concentração de NaOH na fluorescência das tetraciclinas.

Um diagrama característico é apresentado na Figura 5, sendo que a frequência analítica foi de 50 injeções no sistema FIA hora<sup>-1</sup>.

A precisão do método foi avaliada mediante a determinação da precisão intra- e inter-ensaio. A precisão intra-ensaio foi obtida pela avaliação da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) de 10 determinações consecutivas, sendo obtida para um nível de concentração de 0,050 mg L<sup>-1</sup> de OTC, DC e TC, um valor de RSD menor do que 1,0 %.

A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante a análise de soluções contendo 0,050 mg mL<sup>-1</sup> de OTC, DC e TC, em cinco dias diferentes. Todas as injeções no sistema FIA foram realizadas em triplicata, sendo que os valores de RSD para as tetraciclinas em estudo, para três concentrações distintas (0,050; 0,070 e 0,12 mg L<sup>-1</sup>), variaram de 0,90 a 3,0 %.

A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante a análise de soluções contendo 0,050 mg mL<sup>-1</sup> de OTC, DC e TC, em cinco dias diferentes. Todas as injeções no sistema FIA foram realizadas em triplicata, sendo que os valores de RSD para as tetraciclinas em estudo, para três concentrações distintas (0,050; 0,070 e 0,12 mg L<sup>-1</sup>), variaram de 0,90 a 3,0 %.

A detectabilidade nas condições experimentais descritas foi de 120 ng do princípio ativo. Cabe destacar que o LOQ não faz parte do protocolo de validação

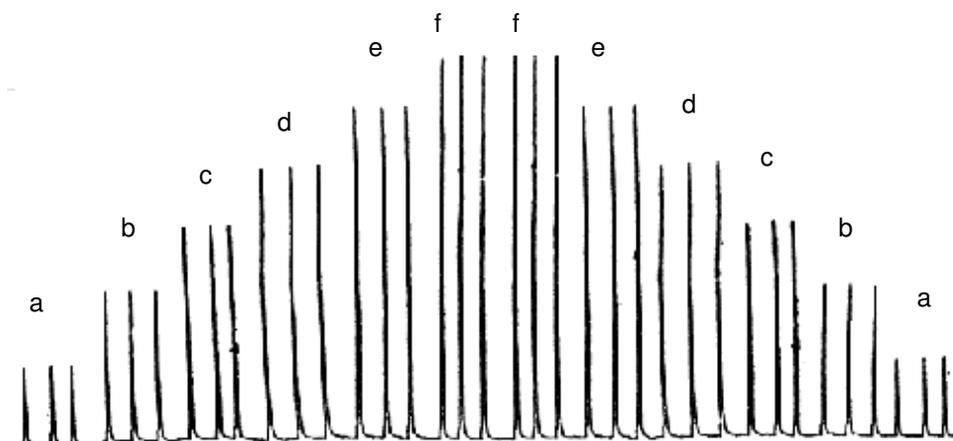


Figura 5. Diagrama de padrão de tetraciclina (oxitetraciclina), nas concentrações ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) de: (a) 0,025; (b) 0,050; (c) 0,075; (d) 0,10; (e) 0,125; e (f) 0,15. Condições: NaOH:  $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$ ; vazão:  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=420 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}}=530 \text{ nm}$ .

de métodos para análise de medicamentos, pois o princípio ativo se encontra em concentração elevada (USP, 2003).

A exatidão foi avaliada através da análise de medicamentos, disponíveis no mercado para administração em gado de leite, à base de OTC, DC e TC mediante testes de recuperação, empregando, para tanto, a padronização externa. Para a realização do teste de recuperação, os medicamentos foram fortificados com 50 % da concentração do princípio ativo determinado na amostra. A recuperação variou de 98 a 104 %, indicando que o método não sofre interferência da matriz e está livre de erros sistemáticos.

Os valores médios dos teores de OTC, TC e DC determinados nas três formulações de uso veterinário, de valor nominal de  $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$ , variaram de 90 a 104 % do valor nominal, tendo sido verificados valores de  $0,052 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,050 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,045 \text{ mg mL}^{-1}$  para a OTC, TC e DC, respectivamente.

Como não há, na legislação brasileira, recomendações a respeito do controle do princípio ativo em medicamentos de uso veterinário à base de OTC, DC e TC e, considerando as recomendações da “United States Pharmacopoeia” (USP, 2003), que estabelece, para medicamentos para uso do ser humano, que o

teor do princípio ativo para essas tetraciclinas deve estar entre 90 a 110 % do valor nominal declarado pelo fabricante do medicamento, podemos afirmar que os medicamentos analisados estão dentro das especificações. Cabe destacar que este estudo não visou o controle de qualidade do medicamento, mas sim o desenvolvimento e validação do método analítico.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos indicam que o método proposto é adequado para a determinação do princípio ativo de medicamentos de uso veterinário à base de tetraciclinas. Embora o método não seja seletivo para diferenciar as várias tetraciclinas, isto não compromete sua aplicabilidade, visto que estas não são veiculadas em associação nos medicamentos utilizados para o tratamento de mastite bovina. O método proposto permite, na ausência de um sistema FIA independente, empregar componentes de um cromatógrafo à líquido e apresenta vantagens por ser simples, dispensar o uso de solventes orgânicos, do baixo custo de reagentes e elevada frequência de amostragem.

## **AGRADECIMENTOS**

Os Autores agradecem o apoio concedido, para a realização desta pesquisa, das agências financiadoras CNPq e FINEP/RECOPE.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AL-MOMANI, I.F. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.25, n.5/6, p.751-757, 2001.
- ALWARTHAN, A.A., ALTAMRAH, S.A., SULTAN, S.M. Spectrophotometric determination of oxytetracycline by flow-injection. *Analyst*, v.116, n.2, p.183-186, 1991.

- ANADÓN, A; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. Residues of antimicrobial drug and feed additives in animal products; regulatory aspects. *Livest. Prod. Sci*, v.59, p. 67-72, 1999.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução RE nº 899 de 29/05/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial da união, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php?ID=5745>>. Acesso em 26 nov 2004.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. presença de resíduos de antibióticos no leite de propriedades leiteiras In: SPINOSA. H.S.; GORNIK, S.L., BERNARDI, M.M., *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- FACCHINI, I., PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistema de fluxo. *Quim. Nova*, v.21, n. 60, 1998.
- ICH, International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CMPM/ICH/281/95), 1995.
- KARLBERG, B.; PACEY, G.E.; *Flow Injection Analysis. A Practical Guide*. New York: Elsevier, (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, v.10), 1989.
- KARLICEK, R., SOLICH, P. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline antibiotics. *Anal. Chim. Acta*, v.285, n.1/2, p.9-12, 1994.
- KUBO, H., SAITOH, M. Chemiluminescence determination on a luminol reaction of  $\beta$ -lactam antibiotics by FIA. *Anal. Sci.*, v.15, n.9, p.919-921, 1999.
- MAHEDERO, M.C., AARON, J.J. Flow-injection determination of sulphonamides with fluorimetric or photochemical-fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta*. v.269, n.2, p.193-198, 1992.
- MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W., McEWEN, S.A., McNAB, W.B., YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence,

- regulations, tests and test performance. *J. Food Prot.*, v.61, n.6, p 742-756, 1998.
- MOATS, W. A., HARIK-KAHN, R. Rapid HPLC Determination of tetracycline antibiotics in milk. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, n.4, p 931-934, 1995.
- NAKAZAWA, H., INO, S., KATO, K., WATANABE, T., ITO, Y., OKA, H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B.*, v.732, n.1, p.55-64, 1999.
- OLIVEIRA, C.A.F., FONSECA, L.F.L., GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados a produção, que influenciam a qualidade do leite. *Hig. Alim.*, v.13, n.62, p.10-6, 1999.
- PENA, A.L.S., SILVEIRA, M.I.N., CASTILHO, B. Antibiotics in food: Determination and quantification by HPLC with fluorescence detection. *Ars pharm.*, v.38, n.1, p.27-37, 1997.
- POIGER, H., SCHLATTER, C. Fluorimetric determination of tetracyclines in biological materials. *Analyst.*, v.101, n.1207, p.808-814, 1976.
- ROBARDS, K., WORSFOLD, P.J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta.*, v.266, n.2, p.147-173, 1992.
- RUZICKA J., HANSEN E.H., Flow injection analysis. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta.*, v.78, p.145-147, 1975.
- RUZICKA, J., HANSEN, E.H. Flow injection analysis.10. Theory, techniques and trends. *Anal. Chim. Acta.*, v.99, n.1, p.37-76, 1978.
- SULTAN, S.M., SULIMAN F.E.O. Chemometric optimization and flow injection method for the determination of norfloxacin in drug formulations. *Analyst.*, v.118, n.5, p. 573-576, 1993.
- USP, United States Pharmacopoeia Convention, US Pharmacopoeia 26, NF 19, Rockville, 2003.

**Este artigo será submetido para publicação na Revista Food Additives  
and Contaminants**

## **CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE TETRACICLINAS EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE E PREPARO E ARMAZENAMENTO DE IOGURTE**

### **RESUMO**

Foi validado um método, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação de resíduos de oxitetraciclina (OTC), doxiciclina (DC) e tetraciclina (TC) em leite e iogurte. O método foi utilizado para avaliar a degradação desses resíduos durante o tratamento térmico do leite, assim como durante o preparo e o armazenamento do iogurte. A extração da amostra foi realizada com ácido tricloroacético (30% v/v) como desproteinizante. Foi utilizada coluna analítica C<sub>8</sub> (fase reversa), fase móvel contendo : [ acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> + EDTA 25 mmol L<sup>-1</sup> + cloreto de cálcio 35 mmol L<sup>-1</sup>] : metanol (65:35 v/v), e detector de fluorescência. A recuperação das tetraciclinas no leite e no iogurte foi de: 92 e 98% (OTC); 87 e 83% (DC) e 89 e 97% (TC), respectivamente, para a concentração de 124 ng mL<sup>-1</sup>. O limite de quantificação foi de 27 ng mL<sup>-1</sup>; 46 ng mL<sup>-1</sup> e 33 ng mL<sup>-1</sup> para OTC, DC e TC, respectivamente. Processos térmicos distintos foram utilizados para avaliar a estabilidade ao aquecimento das tetraciclinas presentes no leite, a saber: aquecimento em fogão, chapa de aquecimento e forno de microondas, verificando-se uma maior degradação na chapa de aquecimento (11%; 28% e 15% para OTC, DC e TC, respectivamente). Em relação à estabilidade das tetraciclinas durante o preparo e vida-de-prateleira do iogurte, verificou-se que concentrações de até 500 ng mL<sup>-1</sup> (OTC), 1120 ng mL<sup>-1</sup> (DC) e 600 ng mL<sup>-1</sup> (TC) não inibiram a produção do iogurte e que, após 30 dias sob refrigeração (4<sup>o</sup>C), ainda remanesceram níveis residuais desses contaminantes nas amostras. Entretanto, em relação aos níveis presentes originalmente no iogurte, os níveis das tetraciclinas diminuíram em 52%; 61% e 67%, para OTC, DC e TC, respectivamente. Os dados obtidos indicam que, em se realizando a avaliação de risco das tetraciclinas à saúde humana, a presença desses contaminantes no leite e iogurte deverá ser levada em consideração como

fonte de exposição. Ainda, no intuito de proteger a saúde dos consumidores, as autoridades competentes deveriam realizar o monitoramento das boas práticas de uso desses agentes antimicrobianos no tratamento do gado produtor de leite para consumo humano, assim como de ações de vigilância sanitária visando o controle dos resíduos dessas substâncias, tanto no leite como no iogurte comercializado.

Palavras-chave: Tetraciclina, agentes antimicrobianos, CLAE, leite, iogurte.

## SUMMARY

A high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of residue levels of oxytetracycline (OTC), doxycycline (DC) and tetracycline (TC) in milk and yogurt was validated. The method was used to evaluate the degradation of these contaminants during the thermal treatment of milk, as well as during yogurt preparation and storage. Sample extraction was carried out using 30% v/v trichloroacetic acid to precipitate the proteins. A C<sub>8</sub> (reverse phase) analytical column was used, mobile phase: [sodium acetate 0.1 mol L<sup>-1</sup> + EDTA 25 mmol L<sup>-1</sup> + calcium chloride 35 mmol L<sup>-1</sup>] : methanol (65:35, v/v), with fluorescence detection. Tetracycline recovery in milk and yogurt was 92 - 98% (OTC); 87 - 83% (DC) and 89 - 97% (TC), respectively. The quantification limit was 27 ng mL<sup>-1</sup>; 46 ng mL<sup>-1</sup> and 33 ng mL<sup>-1</sup> for OTC, DC and TC, respectively. Different thermal treatments were used to evaluate the heat stability of the tetracyclines in milk: cooking stove treatment, hot plate and microwave oven. Higher degradation occurred using the hot plate, 10.9% (OTC); 27.7% (DC) and 15.0% (TC). With respect to the stability of the tetracyclines during the preparation and shelf life of yogurt, it was verified that 500 ng mL<sup>-1</sup> (OTC), 1120 ng mL<sup>-1</sup> (DC) and 600 ng mL<sup>-1</sup> (TC) did not inhibit yogurt production, and that after 30 days under refrigeration (4°C), residual levels of the contaminants still remained in the samples. Nonetheless, in relation to the original contamination in the yogurt, the tetracycline levels had diminished by 52%, 61% and 67%, for OTC, DC and TC, respectively. The data indicated that when conducting a risk assessment of tetracyclines in human health, the presence of these contaminants in milk and

yogurt should be considered as a potential source. In addition, in order to protect consumer health, the governmental agencies should monitor the application of good practices in the use of these antimicrobials in the treatment of cows that produce milk for human consumption, as well as conducting health surveillance actions in order to control the residue levels of these substances in commercialized milk and yogurt.

Key words: tetracyclines, antimicrobials, HPLC, milk, yogurt.

## 1. INTRODUÇÃO

As tetraciclinas representam uma das mais importantes famílias de substâncias com ação farmacológica e, considerando seu largo espectro de ação, são utilizadas como tratamento de primeira escolha nas infecções bacterianas causadas por *chlamydia*, *rickesttsia*, *mycoplasma*, *brucella* e *spirochaeteeae*. (COUTO *et al.*, 2000).

A utilização de tetraciclinas é autorizada em várias espécies de animais produtores de alimentos, incluindo bovinos, suínos, caprinos, aves e pescados (COOPER *et al.*, 1998; SCHENCK e CALLERY, 1998; HAYS, 1986). Os resíduos desses medicamentos nos alimentos podem afetar a saúde dos consumidores dependendo do tipo de composto presente, do alimento consumido e da quantidade de resíduo (ABETE *et al.*, 1997). A utilização de agentes antimicrobianos não autorizados, ou a falta de informações com relação a sua administração, pode resultar na presença de níveis elevados de resíduos nos produtos alimentares (PENA *et al.* 1997).

O uso de agentes antimicrobianos implica na necessidade de métodos seletivos e sensíveis para monitorar os níveis de resíduos em alimentos, em concordância com os limites de tolerância exigidos por requerimentos governamentais (FLETOURIS *et al.*, 1990). De acordo com FURUSAWA (1999), o método analítico para monitorar a presença de resíduos de tetraciclinas em alimentos deverá ser exato, simples, econômico, em tempo e custo, e capaz de

detectar valores abaixo dos LMRs. Assim, IWAKI *et al.* (1992), desenvolveram um método sensível para a determinação de tetraciclina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, com detetor de fluorescência. Foi recomendado o uso de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e de cloreto de cálcio na fase móvel para aumentar a fluorescência das tetraciclina. O fenômeno da formação de complexos entre as tetraciclina e vários cátions tem sido bastante estudado sendo alguns desses complexos fortemente fluorescentes quando comparados com as tetraciclina livres (CROUBELS *et al.*, 1995). Nesse sentido a medida de fluorescência é uma importante ferramenta de detecção de resíduos de fármacos, principalmente quando existe a necessidade de reduzir ou mesmo eliminar os interferentes presentes em matrizes alimentares, uma vez que existem poucos compostos naturais que possuem fluorescência nativa (PENA *et al.*, 1997).

Por outro lado, tem sido relatado que, em geral, devido à elevada estabilidade térmica de grande parte dos agentes antimicrobianos, as temperaturas utilizadas na pasteurização / esterilização do leite, têm pouca ou mesmo nenhuma influência sobre a degradação dos resíduos desses contaminantes (FILHO e DIAS, 2001). Assim, um dos primeiros estudos para avaliar a estabilidade de tetraciclina foi publicado por SHAHANI (1958), que determinou a inativação desses agentes antimicrobianos pelo aquecimento quando presentes em leite e água. Em leite submetido a 71°C, foi necessário um tempo elevado de aquecimento, para a inativação total (clortetraciclina, 280 minutos e oxitetraciclina, 140 minutos), sendo que os agentes antimicrobianos estudados foram mais estáveis em leite do que em água. Mais recentemente, ROSE, *et al.* (1996), relataram que a oxitetraciclina (OTC) é menos estável em água do que em óleo, tendo verificado que a OTC foi instável em água a 100°C/2 minutos, porém estável em óleo a 180°C/8 minutos. Ainda, MOATS (1999), avaliando leite contaminado com oxitetraciclina verificou uma diminuição de aproximadamente 24% na concentração do resíduo do antimicrobiano quando o leite foi submetido a 62°C/30 minutos, de 36% a 71°C/30 minutos e de 100% quando a 121°C/15 minutos.

Em relação ao preparo de iogurte, JURDI e ASMAR (1981), avaliaram a sensibilidade de culturas de iogurte a resíduos de agentes antimicrobianos presentes no leite, tendo verificado que a fermentação era influenciada pela presença de cada um dos seguintes agentes antimicrobianos, individualmente: penicilina ( $0,005 \text{ IU mL}^{-1}$ ), estreptomicina ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), diidroestreptomicina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cloranfenicol ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e oxitetraciclina ( $0,05$  a  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ainda, YAMANI *et al.* (1999), estudaram o comportamento de fermentos lácteos (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* sub-sp. *bulgaricus*), na produção de iogurte, em relação à presença dos agentes antimicrobianos penicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina, tetraciclina, ampicilina, eritromicina e cloxacilina. Os autores verificaram que na ausência dos agentes antimicrobianos houve a coagulação do leite, com formação suficiente de ácido láctico, no período de 2,5 h a  $42^\circ\text{C}$ . Porém, quando os agentes antimicrobianos foram adicionados ao leite, o tempo de incubação, para aparecimento do coágulo, foi de 4 h. Para a oxitetraciclina foram testadas concentrações que variaram de  $0,05$  a  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  e tetraciclina de  $0,1$  a  $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , adicionadas ao leite.

Vários autores têm relatado a presença de tetraciclinas como resíduos no leite (COSTA, 1996). Suspeita-se que exista no Brasil a prática do uso de tetraciclinas como medida preventiva para evitar o aparecimento de mastite bovina e de diarreia no bezerro recém nascido. Todavia, são poucos os estudos disponíveis sobre a estabilidade desses resíduos às condições de processamento dos alimentos em que possam estar presentes, em particular leite e derivados. Assim, no intuito de estudar a estabilidade de tetraciclinas (OTC, DC e TC) em diferentes condições de processamento do leite, foi avaliada a diminuição dos resíduos desses agentes antimicrobianos em função de diferentes condições de aquecimento do leite, assim como na produção e armazenamento sob refrigeração (vida de prateleira) do iogurte. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método de análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes e material

Os padrões analíticos das tetraciclinas foram obtidos dos laboratórios ICN Biomedicals Inc (OTC) e Sigma (DC e TC). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: acetato de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Reagen), cloreto de cálcio (Baker), EDTA (Reagen) e ácido tricloroacético (TCA) (Baker). O metanol foi de grau cromatográfico (Mallinckrodt).

Na extração em fase sólida foram usados cartuchos octadecil, 200 mg (Alltech).

A água utilizada no preparo de todas as soluções foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore).

A amostra de leite utilizada foi do tipo longa vida, desnatado.

A procedência da cultura láctica termófila (*Lactobacillus bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus*) para produção do iogurte foi do laboratório Christian Hansen S.A. (lote 2176236).

No procedimento de extração foi utilizada uma centrífuga Fanem modelo 204-NR e a placa de aquecimento utilizada no tratamento térmico do leite, foi da marca Fisaton - 3501, modelo 752A.

### 2.2. Soluções

As soluções estoque de tetraciclinas foram preparadas pela dissolução de 0,10 g de padrões de OTC, DC e TC em 100 mL de solução de ácido clorídrico 1% v/v. As soluções de trabalho, no intervalo de concentração de 10,0 a 150 ng mL<sup>-1</sup>, foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque em água purificada em sistema Milli-Q. As soluções estoque permaneceram sob refrigeração, sendo utilizadas por um período de, no máximo, 30 dias.

### 2.3. Equipamentos e condições de uso do cromatógrafo

Foi utilizado um cromatógrafo Waters, modelo 406, constituído de bomba isocrática, injetor Rheodyne, alça de amostragem de 20 µL, acoplado a um detector de fluorescência Shimadzu, modelo RF-10A, com cela de 12 µL de

volume e interligado a um integrador Chromjet. A separação foi realizada utilizando-se uma coluna analítica C<sub>8</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Varian) e uma coluna de guarda C<sub>8</sub> (7,5 x 6 mm, 5 µm) (Alltech), usando uma fase móvel aquosa com [acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> + EDTA 25 mmol L<sup>-1</sup> + cloreto de cálcio 35 mmol L<sup>-1</sup>] : metanol (65:35, v/v). A fase móvel foi filtrada em sistema de filtração Millipore com membrana de 0,45 µm e degaseificada em banho de ultra-som, anteriormente ao uso. A vazão da fase móvel foi de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Para determinar os comprimentos máximos de emissão e excitação, foi utilizado um espectrofluorímetro modelo Perkin-Elmer LS 55, com cubeta de quartzo de 10 mm, a 23 ± 1 °C.

Para o ensaio de tratamento térmico, utilizou-se um forno microondas da marca Panasonic - Píccolo, modelo NN-SH2BH, tensão de alimentação 120v – 60Hz e frequência de microondas de 2450 MHz e concentração de energia 1400w.

#### **2.4. Preparo da amostra**

O preparo das amostras foi baseado no trabalho de FURUSAWA, 1999. Para tanto, amostras de leite (1,0 mL) e iogurte (1,0 g) foram adicionadas em tubo Eppendorf com 0,50 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30% (v/v). O tubo foi agitado por 1 min e centrifugado por 10 minutos a 2500 g. A solução sobrenadante foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 µm x 13 mm e o filtrado, injetado no sistema cromatográfico. Todas as injeções foram realizadas em triplicata.

#### **2.5. Validação do método**

Na validação do método para a determinação de tetraciclina em leite e iogurte, foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Linearidade, faixa linear e sensibilidade foram estabelecidas a partir de curvas analíticas, sendo linearidade expressa pelo coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica. A curva analítica (triplicata) para cada analito foi determinada mediante análise de soluções padrão

de OTC, DC e TC em 6 níveis de concentração, no intervalo de 10,0 a 150 ng mL<sup>-1</sup>.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram estabelecidos pela relação sinal/ruído igual a 3 e 10, respectivamente, nos respectivos tempos de retenção da OTC, DC e TC. O LOQ foi confirmado pela análise de amostra de leite ou iogurte fortificada com o nível de concentração estabelecido.

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise de duas amostras de leite ou iogurte fortificados com OTC, DC e TC, na concentração de 96 ng mL<sup>-1</sup> em um mesmo dia, sendo que cada amostra foi injetada 10 vezes. A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante a análise de 5 amostras de leite ou iogurte fortificadas com OTC, DC e TC nas concentrações de 40 e 124 ng mL<sup>-1</sup>, em 5 dias diferentes. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em triplicata. As precisões intra- e inter-ensaio foram expressas pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação (3 níveis de fortificação, análise em duplicata) de 1,0 mL de leite ou 1,0 g de iogurte e foram adicionados de OTC, DC e TC para concentrações de 40; 96 e 124 ng mL<sup>-1</sup> (leite) ou 40; 96 e 124 ng g<sup>-1</sup> (iogurte) .

## **2.6. Tratamento térmico do leite**

Foram utilizados três processos distintos de tratamento térmico do leite, com aquecimento: 1) em fogão; 2) em placa de aquecimento, e 3) em forno de microondas. Em todos os tratamentos, após atingir a temperatura de 72°C, esta foi mantida por 15 segundos, seguido de resfriamento em banho de gelo. O volume de leite aquecido foi de 50 mL e as concentrações das tetraciclinas nas amostras foram: OTC (510 e 660 ng mL<sup>-1</sup>), DC (700 ng mL<sup>-1</sup>) e TC (500 e 590 ng mL<sup>-1</sup>). Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.

## **2.7. Processamento de iogurte**

### **2.7.1. Preparo do inóculo**

Leite em pó desnatado (27,5 g) foi adicionado em água em ebulição (250 mL) e, imediatamente após a dissolução do leite, a solução foi resfriada em banho de gelo, até atingir a temperatura de 45°C. A seguir, foram adicionados 0,025 g de cultura liofilizada termófila (*Lactobacillus bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus*), sendo as amostras inoculadas, incubadas em estufa a 45°C, por 4 h. Ao final deste tempo, as amostras (cultura termófila) foram retiradas da estufa, esfriadas em banho de gelo e mantidas sob refrigeração (4°C).

### **2.7.2. Preparo do iogurte**

As amostras de iogurtes foram produzidas utilizando-se leite desnatado longa vida (50 mL), inoculadas com a cultura termófila (1 mL), colocadas em estufa (45°C/4 h) e mantidas sob refrigeração (4°C), em frascos com tampa rosqueada, durante 30 dias. Em relação às tetraciclinas, amostras de leite foram fortificadas com OTC (500 ng mL<sup>-1</sup>), DC (1120 ng mL<sup>-1</sup>) e TC (600 ng mL<sup>-1</sup>), tendo sido avaliadas quanto à formação do coágulo e estabilidade das tetraciclinas durante o preparo e armazenamento (4°C) do iogurte. Na Tabela 1 são apresentadas as condições experimentais utilizadas no preparo e estocagem do iogurte.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Desenvolvimento do método**

Um dos problemas na determinação de tetraciclinas por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando colunas analíticas de fase reversa com suporte de sílica, é a ocorrência de interações entre as tetraciclinas e os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária, assim como a formação de complexos das tetraciclinas com íons metálicos, eventualmente presentes na superfície do material da fase estacionária. Em adição, as tetraciclinas são substâncias anfóteras o que prejudica a interação com a fase estacionária quando se emprega a cromatografia de fase reversa. Várias fases estacionárias têm sido

sugeridas na determinação de tetraciclinas, como octil e octadecil. Muitos autores sugerem o emprego de par iônico, assim como a adição de EDTA e  $\text{CaCl}_2$  na fase móvel (IWAKI *et al.*, 1992, REEUWIJK *et al.*, 1986).

Em decorrência da diversidade de condições analíticas recomendadas na literatura, realizou-se um estudo para estabelecer as melhores condições de análise no que concerne à fase estacionária e fase móvel. Para tanto, foram avaliados: (i) fases estacionárias: octilsilano e octadecilsilano e (ii) fase móvel (composição, pH, adição de par iônico, EDTA e/ou  $\text{CaCl}_2$ ). As condições otimizadas foram: fase estacionária octilsilano e como fase móvel acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  + EDTA  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  + cloreto de cálcio  $35 \text{ mmol L}^{-1}$ : metanol (65:35, v/v).

A adição de EDTA e íons cálcio na fase móvel promoveram o aumento da intensidade de fluorescência apresentada pelas tetraciclinas, o que melhorou a sensibilidade do método cromatográfico, visto ter sido utilizado o detetor de fluorescência. O acetato de sódio foi também usado como agente bloqueador dos grupos silanóis, promovendo melhoria na recuperação das tetraciclinas e na

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas no preparo e estocagem do iogurte.

	Ensaio						
	A	B	C	D	E	F	G
Leite (mL)	50	50	50	50	50	50	50
Agente antimicrobiano	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Inóculo	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Estufa ( $45^\circ\text{C}$ )	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Tempo de estocagem ( $4^\circ\text{C}$ )	(-)	(-)	(-)	(-)	7 dias	15 dias	30 dias

Onde:

A = Controle do inóculo na formação do iogurte.

B = Controle da degradação do antimicrobiano.

- C = Degradação do agente antimicrobiano em função da temperatura (C/B).  
D = Degradação do agente antimicrobiano em função do preparo do iogurte (D/B).  
E = Degradação do agente antimicrobiano em função da estocagem do iogurte (E/B).  
F = Degradação do agente antimicrobiano em função da estocagem do iogurte (F/B).  
G = Degradação do agente antimicrobiano em função da estocagem do iogurte (G/B).

resolução cromatográfica, conforme já relatado por PENA *et al.* (1997). Cabe mencionar que a detecção por fluorescência foi utilizada para minimizar as respostas devidas aos interferentes presentes no leite e iogurte e, assim, tornar o método mais sensível e seletivo para análise de leite ou iogurte, quanto à presença de tetraciclinas. Com esse propósito, os comprimentos máximos de excitação e emissão foram determinados através de espectros de varredura obtidos em espectrofluorímetro para cada uma das três tetraciclinas, separadamente e diluídas na própria fase móvel do sistema cromatográfico (SEVERO SILVA JR, *et al.* 2004).

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas e avaliada a adequabilidade do sistema cromatográfico para a separação das tetraciclinas foi avaliado o preparo de amostra.

O leite é uma matriz especialmente complexa devido à presença da emulsão lipídica e, portanto, a quebra e extração de traços de gordura são necessárias antes da extração do analito, para posterior determinação cromatográfica. De modo geral, o preparo de amostras visa a eliminação de interferentes e a pré-concentração do analito para que este possa ser determinado com adequada exatidão e precisão. No entanto, a maioria dos procedimentos analíticos são laboriosos e requerem várias etapas unitárias antes da medida da concentração do analito de interesse. Para a determinação de tetraciclinas em matrizes diversas procedimentos de extração líquido-líquido e de extração em fase sólida estão descritos na literatura (WALSH, *et al.* 1992 e MACK, 1978).

Avaliando o emprego da extração em fase sólida em cartuchos C<sub>18</sub> foi verificada baixa recuperação para todas as tetraciclinas sob estudo e uma co-eluição de um número elevado de interferentes, quando empregada a matriz leite.

Empregando um cartucho de octadecilsilano de 200 mg e aplicando 2 mL de uma solução padrão de OTC, DC e TC de 50 ng mL<sup>-1</sup> e eluindo os analitos com 5 mL de MeOH, a recuperação foi menor que 30% para todas as tetraciclina. No entanto, usando metanol acidificado com ácido acético, em pH 5, a recuperação foi de 72; 83 e 110% para OTC, DC e TC, respectivamente. Embora esses resultados de recuperação possam ser aceitáveis, levando em consideração o nível de concentração, não foram satisfatórios quando empregado leite fortificado no mesmo nível de concentração, pois houve co-eluição de um número elevado de interferentes o que inviabilizou a quantificação dos analitos, nestas condições experimentais.

No entanto, precipitando-se as proteínas do leite com ácido tricloroacético (TCA) 30% v/v e separando o sobrenadante, foi possível realizar a quantificação das tetraciclina com uma recuperação no intervalo de 67 a 98% para todas as tetraciclina, sem co-eluição de interferentes na determinação cromatográfica. Assim sendo, foi possível a determinação de tetraciclina nas matrizes leite ou no iogurte, sem etapas adicionais de limpeza do extrato. O método desenvolvido apresenta a vantagem de poder determinar no leite e iogurte, resíduos de OTC, DC e TC, utilizando a CLAE e dispensando procedimentos complicados de extração e limpeza do extrato conforme relatado por MOATS, 1995, (extração líquido-líquido e concentração do eluato) e BARKER & WALKER, 1992, (extração em fase sólida utilizando cartuchos C<sub>8</sub>). O procedimento proposto, além de simples e de menor tempo e custo de análise, não requer o uso de solventes orgânicos.

### **3.2. Validação do método**

A qualidade e a credibilidade de um resultado analítico fundamentam-se nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida. A primeira etapa para obtenção de resultados confiáveis está na validação da metodologia analítica escolhida.

Na validação do método para a determinação de OTC, DC e TC em leite e em iogurte foram avaliados os seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, tendo como base as

recomendações da Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Os cromatogramas característicos de uma amostra de leite (branco), padrões das tetraciclinas sob estudo e de uma amostra de leite fortificada com OTC, DC e TC estão apresentados na Figura 1.

Na Figura 2 são apresentados cromatogramas de uma amostra de iogurte (branco) e uma amostra de iogurte fortificada com OTC, DC e TC.

Os extratos obtidos a partir do leite e iogurte não apresentaram interferentes em potencial, conforme pode ser verificado pelos cromatogramas apresentados nas Figura 1 e 2. O pico em torno de 5,5 minutos foi identificado como sendo a riboflavina (SEVERO SILVA JR, *et al.*, 2004), substância naturalmente presente no leite que, nas condições de análise, não interfere na quantificação dos demais analitos. O tempo total para obtenção dos cromatogramas foi de, aproximadamente, 15 minutos.

A recuperação das tetraciclinas nas amostras de leite e iogurte foi determinada pela comparação da concentração obtida quando a amostra foi adicionada de cada tetraciclina, e submetida ao processo de extração, e a concentração obtida quando a amostra, sem a presença de tetraciclinas, foi submetida ao processo de extração e, no filtrado final, adicionada dos padrões de OTC, DC e TC (Tabela 2). As porcentagens de recuperação nos três níveis de fortificação avaliados, para os três agentes antimicrobianos em estudo, se situaram na faixa de 67 a 97% e 74 a 98% para a matriz leite e iogurte, respectivamente e estão de acordo com os valores internacionalmente aceitos para análise de resíduos, confirmando a exatidão do método.

Tabela 2. Parâmetros de validação por CLAE para tetraciclina em leite e iogurte.

Parâmetros	Tetraciclina					
	OTC		DC		TC	
	Leite	iogurte	Leite	iogurte	Leite	iogurte
Faixa linear (ng mL <sup>-1</sup> )	10 - 150		10 - 150		10 - 150	
Sensibilidade (u.a* ng <sup>-1</sup> mL)	7,1 x 10 <sup>3</sup>		2,1 x 10 <sup>3</sup>		6,6 x 10 <sup>3</sup>	
Linearidade (r)	0,9953		0,9940		0,9838	
Precisão intra-ensaio (%)						
96 ng mL <sup>-1</sup>	0,53	0,54	0,56	0,55	0,30	0,56
Precisão inter-ensaio (%)						
40 ng mL <sup>-1</sup>	0,60	0,61	-	-	0,44	0,67
124 ng mL <sup>-1</sup>	0,67	0,64	0,55	0,94	0,42	0,60
LOD						
Leite (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	8	8	14	20	10	10
iogurte (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>						
LOQ						
Leite (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	27	27	47	67	33	33
iogurte (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>						
Recuperação (%)						
40 ng mL <sup>-1</sup>	97	96	-	-	97	96
96 ng mL <sup>-1</sup>	87	80	67	74	87	97
124 ng mL <sup>-1</sup>	92	98	87	83	89	

\* u.a: unidades de área. (a) O LOD e LOQ foram calculados para 1,0 mL de leite ou 1,0 g de iogurte.

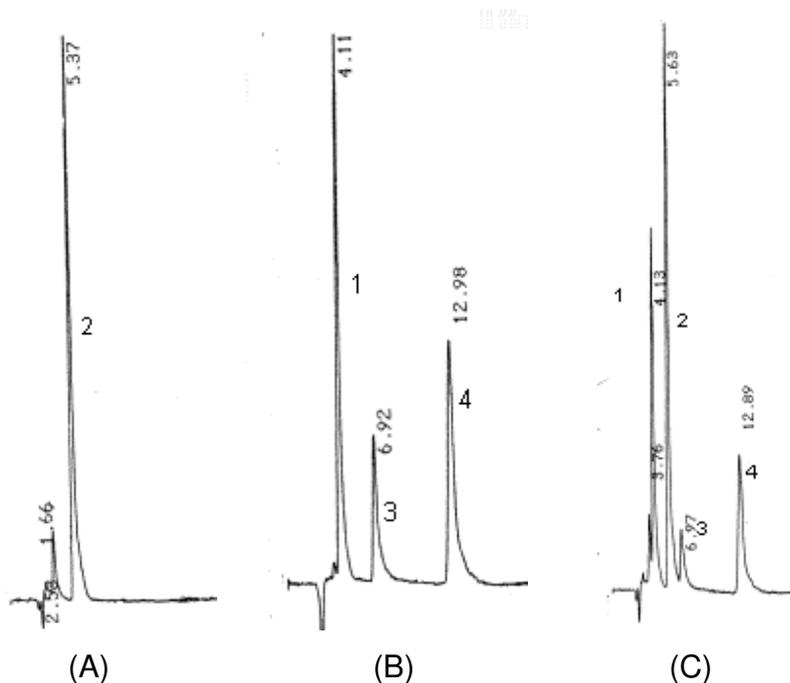


Figura 1. Cromatogramas obtidos na determinação de tetraciclina em leite: (A) Amostra de leite (controle); (B) Padrões de oxitetraciclina ( $t_r = 4,11$ ), doxiciclina ( $t_r = 6,92$ ) e tetraciclina,  $t_r = 12,98$  respectivamente, nas concentrações de  $180 \text{ ng mL}^{-1}$ ; (C) Amostra de leite fortificada com oxitetraciclina ( $t_r = 4,13$ ), doxiciclina ( $t_r = 6,97$ ) e tetraciclina ( $t_r = 12,89$ ), respectivamente, nas concentrações de  $180 \text{ ng mL}^{-1}$ , onde (1) oxitetraciclina; (2) vitamina B<sub>2</sub>; (3) doxiciclina e (4) tetraciclina. Condições cromatográficas descritas no texto.

O limite de quantificação (LOQ) da oxitetraciclina ( $27 \text{ ng mL}^{-1}$ ), doxiciclina ( $47 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e tetraciclina ( $33 \text{ ng mL}^{-1}$ ), foram menores do que os valores dos limites máximo de resíduos (LMRs) recomendados em leite conforme estabelecido pelo Codex Alimentarius e por legislações regionais (União Européia e MERCOSUL) e nacionais (Brasil). Todavia, cabe destacar que para doxiciclina ainda não existe um valor de LMR estabelecido, assim como também não existe valor de LMR estabelecido para a presença de tetraciclina no iogurte.

### 3.3. Degradação térmica dos agentes antimicrobianos

No estudo da degradação dos agentes antimicrobianos durante os tratamentos térmicos esperou-se atingir a temperatura de  $72^\circ\text{C}$  tendo-se verificado, para cada tratamento, um tempo diferente para a mesma ser atingida,

a saber: forno de microondas (35 segundos); fogão (48 segundos) e chapa de aquecimento (114 segundos).

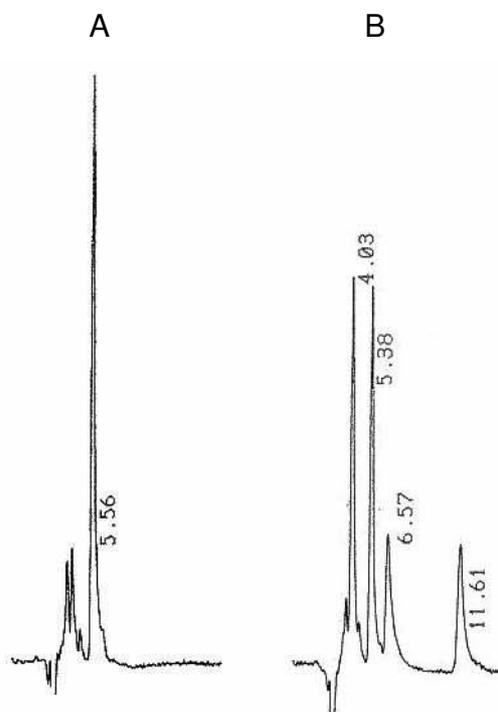


Figura 2. Cromatogramas obtidos na determinação de tetraciclina em iogurte: (A) Amostra de iogurte (controle); (B) Amostra de iogurte fortificada com 124 ng g<sup>-1</sup> de oxitetraciclina ( $t_r = 4,03$ ), doxiciclina ( $t_r = 6,57$ ) e tetraciclina ( $t_r = 11,61$ ), respectivamente. Condições cromatográficas descritas no texto.

No intuito de simular o processo de pasteurização, as amostras foram mantidas nessa temperatura por 15 segundos, sendo resfriadas imediatamente em banho de gelo. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que o leite adicionado das tetraciclina, submetido ao tratamento térmico em placa de aquecimento apresentou a maior porcentagem de degradação para todos os agentes antimicrobianos estudados.

Ainda, conforme apresentado na Figura 4, verifica-se que a degradação das tetraciclina está relacionada com o tempo de permanência sob aquecimento. Apesar de que no presente estudo ter verificado uma maior taxa de degradação, os dados obtidos corroboram aqueles publicados por MOATS (1999), quem

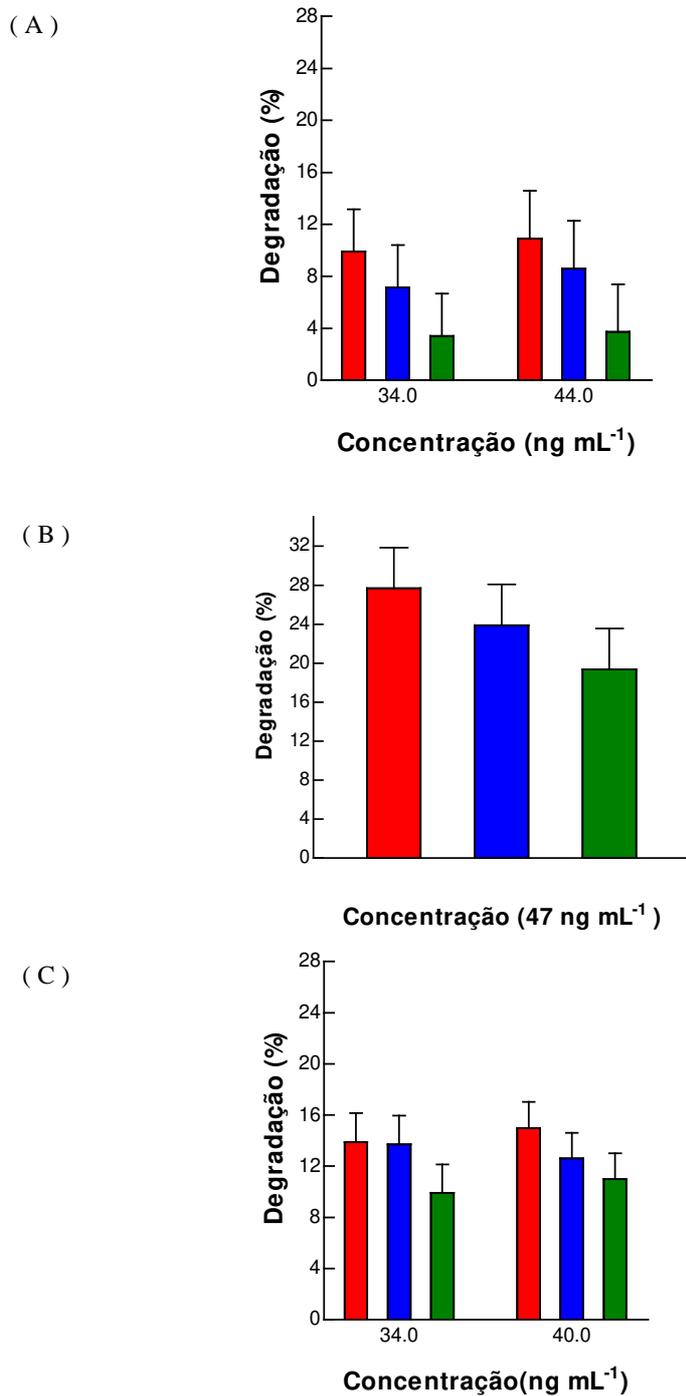


Figura 3. Degradação da (A) oxitetraciclina, (B) doxiciclina e (C) tertraciclina, em função do tratamento térmico do leite. Legenda: ■ Aquecimento em placa; ■ em fogão e ■ em forno de microondas.

relatou que o leite contaminado com oxitetraciclina apresentava degradação do antimicrobiano de 24% (62°C/30 min), 36% (71°C/30 min) e 100 % (121°C/15 min) e por SHAHANI (1958), que indicou que seriam necessários 140 minutos para completa inativação da oxitetraciclina, à temperatura de 71 °C.

Conseqüentemente, é de se esperar que as tetraciclinas sejam estáveis nas condições de aquecimentos utilizadas nos processos industriais de pasteurização (72°C/15 segundos) e de esterilização (149°C/4 segundos). Dessa forma, visando a proteção da saúde dos consumidores, torna-se necessário o monitoramento das boas práticas de uso desses agentes antimicrobianos no tratamento do rebanho produtor de leite para consumo humano, assim como ações de vigilância sanitária visando o controle dos resíduos dessas substâncias no leite comercializado. Todavia, cabe mencionar que, segundo MOATS, 1988, o mecanismo de degradação das tetraciclinas durante o aquecimento ainda não está esclarecido e que, mesmo com a eliminação ou diminuição da atividade antimicrobiana, os compostos formados poderão produzir respostas alérgicas em pessoas sensíveis

#### **3.4. Estabilidade das tetraciclinas no preparo e armazenamento do iogurte**

Na Figura 5 são apresentados os dados obtidos sobre a degradação das tetraciclinas durante o processamento e vida-de-prateleira do iogurte. Nas concentrações utilizadas, os agentes antimicrobianos não evitaram a produção do iogurte, porém aumentaram o tempo de formação do coágulo. Assim, em relação ao controle (4 h/45°C), foi necessário um tempo maior de incubação na estufa (5h /45°C), para que ocorresse a coagulação em todas as amostras contaminadas. Resultados de degradação de tetraciclina também foram obtidos por COGAN (1972), onde foi observado que culturas *starter* (*S .thermophilus*) apresentaram uma degradação de 50 e 100 %, para a adição de 200 e 500 ng mL<sup>-1</sup> respectivamente, de tetraciclina. Por outro lado, culturas contendo (*L. bulgaricus*) apresentaram uma degradação de 50 e 100 %, para a adição de 340 e 2000 ng mL<sup>-1</sup> respectivamente, de tetraciclina.

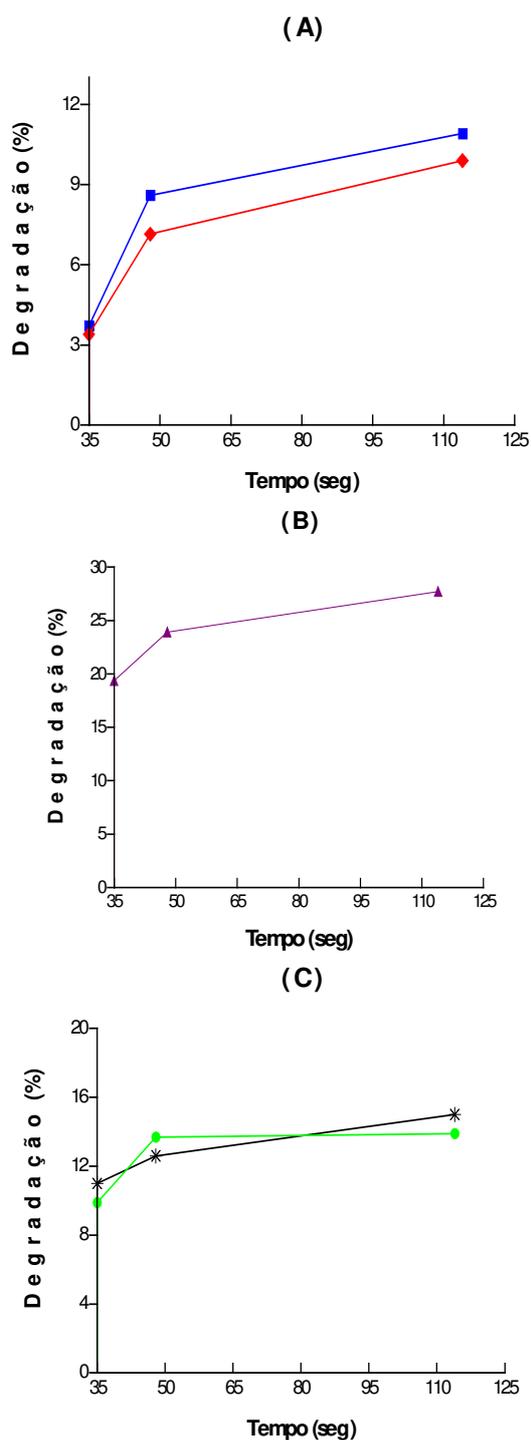


Figura 4. Degradação da (A) oxitetraciclina ( $\blacklozenge$   $C_1 = 34 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $\blacksquare$   $C_2 = 44 \text{ ng mL}^{-1}$ ), (B) doxiciclina ( $\blacktriangle$   $C_3 = 47 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e (C) tetraciclina ( $\bullet$   $C_4 = 34 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $*$   $C_5 = 40 \text{ ng mL}^{-1}$ ), em função do tempo de aquecimento do leite.

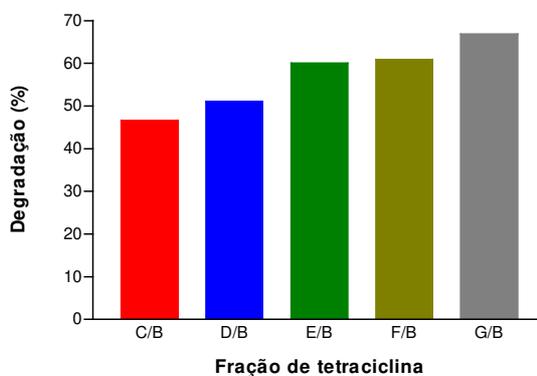
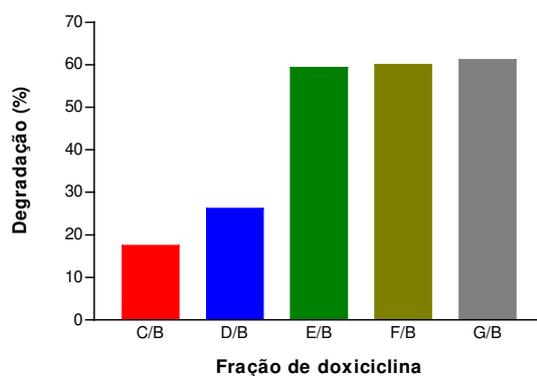
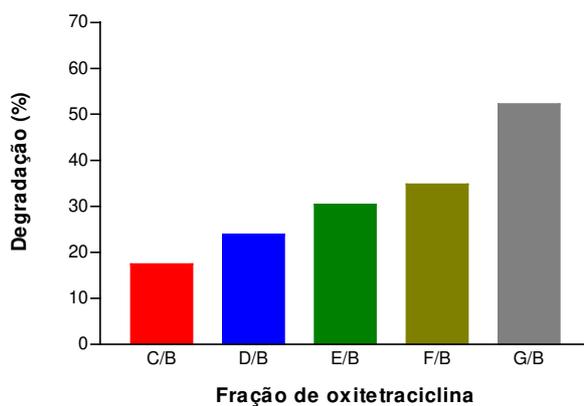


Figura 5. Degradação da oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina, durante o processamento e estocagem do iogurte. Legenda: C/B (Degradação do agente antimicrobiano em função da temperatura), D/B (do preparo do iogurte: tempo zero), E/B (da estocagem do iogurte: 7 dias), F/B (da estocagem do iogurte: 15 dias), G/B (da estocagem do iogurte: 30 dias).

Os dados obtidos indicam que a estabilidade das tetraciclina foi diferenciada tanto durante a etapa de preparo como de estocagem do iogurte. Em geral, foi verificado menor degradação para a OTC do que para a DC e TC. Todavia, níveis importantes de resíduos permaneceram durante a estocagem do iogurte o que indica que esse alimento pode ser uma fonte potencial de exposição humana às tetraciclina.

Assim, visando avaliar a atividade da cultura utilizada (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*), ao término do processo de formação do coágulo, após 5 horas a 45°C para todas as amostras, foi medido o pH de todas elas, visto que o pH está relacionado com a produção de ácido láctico. Este valor foi designado como pH do dia zero. Pelos resultados obtidos (Tabela 3) verifica-se que, ao final do período de 5 horas de incubação, as amostras contaminadas apresentaram valores de pH superiores àqueles das amostras controle (sem agentes antimicrobianos). Ainda, as amostras adicionadas com concentrações mais elevadas de tetraciclina, apresentaram pH superior às amostras com concentrações menores, indicando inibição da produção de ácido láctico em função da concentração das tetraciclina no leite. Por outro lado, durante o período de estocagem do iogurte, o pH das amostras apresentou, apenas pequenas variações.

Tabela 3. Valores de pH durante o armazenamento do iogurte.

Dias	pH após 5 h em estufa à 45°C							
	Ensaio (Controle)		OTC 500 ng mL <sup>-1</sup>		DC (1120 ng mL <sup>-1</sup> )		TC (600 ng mL <sup>-1</sup> )	
	A	B						
0	3,96	3,93	4,78	4,70	5,10	5,08	4,96	4,62
7	3,87	3,84	4,56	4,40	4,99	5,00	4,90	4,40
15	3,83	3,73	4,59	4,32	4,93	5,00	4,88	4,34
30	3,85	3,70	4,51	4,20	4,86	4,93	4,78	4,30

#### **4. CONCLUSÕES**

A metodologia utilizada mostrou-se eficiente de acordo com os parâmetros de validação obtidos (limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e inter-ensaio e exatidão), podendo ser utilizada como método de monitoramento para a detecção e quantificação de resíduos de tetraciclinas em leite e iogurte. O método apresenta as seguintes vantagens: possui alta sensibilidade e seletividade, permite a identificação e quantificação individual de resíduos de tetraciclinas abaixo dos LMRs, possui alta resolução e versatilidade, além de curto tempo para execução de análise.

Os níveis de resíduos de tetraciclinas (oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina) presentes no leite, não são totalmente eliminados nas condições de tratamento térmico estabelecidas. A contaminação do leite com tetraciclinas, em concentrações de até 500 ng mL<sup>-1</sup> (OTC), 1120 ng mL<sup>-1</sup> (DC) e 600 ng mL<sup>-1</sup> (TC), não foram suficientes para inibir o processo fermentativo (formação do coágulo), não tendo sido verificada variação importante nos níveis residuais desses contaminantes durante o período de vida-de-prateleira do iogurte. Assim, recomenda-se o monitoramento das boas práticas de uso desses agentes antimicrobianos no tratamento do gado produtor de leite para consumo humano, assim como ações de vigilância sanitária visando o controle dos resíduos dessas substâncias, tanto no leite como no iogurte comercializado.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

Os Autores agradecem ao apoio das agências financiadoras CNPq, FAPESP, FINEP e RECOPE, para a realização desta pesquisa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABETE, M.C.; GENTA, E. & SQUADRONE, S. 1997, Tetracycline nel latte: Determinazione mediante HPLC / DAD. *Industrie Alimentaria*, **26**, 753-766.

BARKER, S. A. & WALKER, C.C. 1992, Chromatographic methods for tetracycline analyses in foods, *Journal of Chromatography*, **624**,195-209.

BRASIL, Leis, Decretos. Portaria nº 72, de 3 de junho de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, nº 107, 8 de junho de 1998. Seção I, p.131. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite - PCRBL].

COGAN, T.M. 1972, Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotics, *Applied Microbiology*, **23**, 960.

COOPER, A.D.; STUBBINGS, G.W.F.; KELLY, M.; TARBIN, J.A.; FARRINGTON, W.H.H. & SHEARER, G. 1998, Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products, *Journal of Chromatography A*, **812**, 321-326.

COSTA, E.O. 1996, Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, **10**,15-17.

CROUBELS, S.; BAEYENS, W. & PETERGHEM, C.V. 1995, Post-column zirconium chelation and fluorescence detection for the liquid chromatographic determination of tetracyclines, *Analytica Chimica Acta*, **303**, 11-16.

FEDENIUK, R.W. & SHAND, P.J. 1998, Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices, *Journal of Chromatography A*, **812**, 3-15.

FILHO, J.F. & DIAS, J.G. 2001, Antibióticos no leite: Problemas e Conseqüências. Artigo técnico, *Qualidade em Dia*, **16**, 6-7.

FLETOURIS, D.J.; PSOMAS, J.E. & BOTSOGLU, N.A. 1990, Trace analysis of oxitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography, *Journal Agriculture Food Chemistry*, **38**, 1913-1917.

FURUSAWA, N. 1999, Rapid liquid chromatographic determination of oxitetracycline in milk. *Journal of Chromatography A*, **839**, 247-251.

HAYS, V.W. Agriculture uses of antibiotics (ACS Symposium Series), American Chemical Society, cap.7, p.74, 1986.

IWAKI, K.; OKUMURA, N. & YAMAZAKI, M. 1992, Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography*, **623**, 153-158.

JURDI, D.A. & ASMAR, J.A. 1981, Use of simple fermentation test to detect antibiotic residues in milk, *Journal of Food Protection*, **44**, 674-676.

MACK, G.M. & ASHWORTH, R.B. 1978, A High performance liquid chromatographic system for the analysis of tetracycline drug standards, analogs degradation products and other impurities, *Journal of Chromatographic Science*, **16**, 93-101.

MITSCHER, L.A. 1978, The chemistry of the tetracycline antibiotics, 1<sup>st</sup> Ed., Marcel Dekker, New York, 91.

MOATS, W.A. 1988, Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates - A review, *Journal of Food Protection*, **51**, 491-497.

MOATS, W.A. 1995, Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **43**, 931.

MOATS, W.A. 1999, The effect of processing on veterinary residues in foods, *Advance Experience Medical Biologic.*, **459**, 233-241.

NIKOLOV, N.M. 1973. Properties of lyophilized cultures of lactic bacteria in sour milk, *Mikrobiologiya*, **42**, 1049-1051.

OKA, H.; UNO, K.; HARADA, K-I. & SUZUKI, M. 1984, Improvement of chemical analysis of antibiotics. III Simple method for the analysis of tetracycline on reversed-phase thin-layer plates, *Journal of Chromatography*, **284**, 227-234.

PENA, A.L.S.; SILVEIRA, M.I.N. & CASTILLO, B. 1997, Antibióticos em alimentos: Determinação e quantificação por HPLC com detecção fluorimétrica, *Arquivos Pharmaceutica*, **38**, 27-37.

PIGGER, H. & SCHLATTER, C. 1976, Fluorimetric determination of tetracyclines in biological materials, *Analyst*, **101**, 808-814.

REEUWIJK, H.J.E.M. & TJADEN, U.R. 1986, High-Performance liquid chromatography of tetracyclines, *Journal of Chromatography*, **353**, 339-350.

ROSE, M.D.; BYGRAVE, J.; FARRINGTON, W.; SHEARER, G. 1996, The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4.oxytetracycline, *Food Additives and Contaminants*, **13**, 275-286.

SCHENCK, F.J. & CALLERY, P.S. 1998, Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk, *Journal of Chromatography A*, **812**, 99-109.

SEVERO SILVA JR, L.; TREVISAN, M.G.; RATH, S.; POPPI, R. J.; REYES, F.G.R. 2004, Chromatographic determination of riboflavin in the presence of

tetracyclines in skimmed and whole milk using fluorescence detection, Artigo submetido a publicação na revista: *Journal of the Brazilian Chemical Society*.

SHABIR, G.A. 2003, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *Journal of Chromatography A*, **987**, 57-66.

SHAHANI, K.M. 1958, Factors affecting terramycin activity in milk, broth, buffer and water, *Journal of Dairy Science*, **41**, 382-391.

WALSH, J.R.; WALKER, L.V. WEBBER, J.J. 1992, Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid-chromatography using solid-phase extraction, *Journal of Chromatography*, **596**, 211-216.

YAMANI, M.I.; AL-KURDI, L.M.A.; HADDADIN, M.S.Y.; ROBINSON, R.K. 1999, A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk, *Food Control*, **10**, 35-39.

**Este artigo foi submetido para publicação no Journal of the Brazilian  
Chemical Society**

**CAPÍTULO IV – DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE RIBOFLAVINA NA  
PRESENÇA DE TETRACICLINAS EM LEITE INTEGRAL E DESNATADO  
UTILIZANDO DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA.  
“CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF RIBOFLAVIN IN THE  
PRESENCE OF TETRACYCLINES IN SKIMMED AND WHOLE MILK USING  
FLUORESCENCE DETECTION”**

**RESUMO**

Foi estabelecido um método cromatográfico rápido e simples para a determinação de riboflavina em leite bovino, na presença de tetraciclina. Para tanto, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 30%(v/v), a separação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) com detector de fluorescência. Foi utilizada uma coluna C<sub>8</sub> com eluição isocrática e fase móvel aquosa composta por acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, cloreto de cálcio 35 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 25 mmol L<sup>-1</sup> e metanol (65:35 v/v). O método foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade (0,9980), faixa linear (0,50 a 1,30 µg mL<sup>-1</sup>), precisão intra- e inter-ensaio (RSD ≤ 0.5%), exatidão (recuperação 92 %) e limites de detecção e de quantificação (0,22 µg mL<sup>-1</sup> e 0,75 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). O método foi aplicado na análise de leite integral e desnatado, mostrando-se robusto na presença de substâncias fluorescentes como as tetraciclina e, quando comparado com o método espectrofluorimétrico, não revelou diferença significativa (p ≤ 0,05) entre os resultados obtidos.

Palavras-chave: Vitamina B<sub>2</sub>, HPLC, cromatografia, fluorescência molecular, tetraciclina.

## SUMMARY

An easy and simple HPLC method for the determination of riboflavin in bovine milk in the presence of tetracyclines was established. For this purpose, proteins were precipitated with 30% (v/v) trichloroacetic acid and separation was carried out by reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection. A C<sub>8</sub>-column was used with isocratic flow using a mobile phase consisting of 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium acetate, 35 mmol L<sup>-1</sup> calcium chloride and 25 mmol L<sup>-1</sup> EDTA:methanol (65:35 v/v). The method was validated according to the following parameters: linearity (0.9980), linear range (0.50 - 1.30 µg mL<sup>-1</sup>), intra- and inter-assay precision (RSD ≤ 0.5%), accuracy (recovery 92 %), and detection and quantification limits (0.22 µg mL<sup>-1</sup> and 0.75 µg mL<sup>-1</sup>, respectively). The method was applied to the analyses of whole and skimmed milk, showing robustness in the presence of tetracyclines, and no significant difference (p ≤ 0.05) between the results obtained when compared with a spectrofluorimetric method.

Keywords: Vitamin B<sub>2</sub>, HPLC, Chromatography, Molecular Fluorescence, Tetracyclines.

## 1. Introduction

Riboflavin (RF) is an important vitamin of the B complex (vitamin B<sub>2</sub>) acting as an intermediary in the transfer of electrons in biological redox reactions and having an important function in cell growth. As with all vitamins of the B complex, RF is only synthesized by microorganisms and higher vegetables, not by animals, which must obtain it from their food. Considering the high concentrations of B complex vitamins present in meat and milk, these foods are the best natural sources of RF in the human diet in the western world<sup>1</sup>.

RF is stable during heat processing, such as pasteurization, evaporation or condensation, which have little effect on the variation in RF present in dairy products. However, considerable loss may occur due to photodegradation from exposure of food to light. Another important loss of RF occurs due to its water soluble profile and it is found in juices, whey and cooking waters<sup>2</sup>. Thus, it is interesting not only to monitor the RF concentration in dairy products but also to study the influence of manufacturing and storage processes on its variation. In addition, studies<sup>4</sup> have shown that alterations in some of the organoleptic features of bovine milk and other liquids, like wine and beverages, have a correlation with RF photodegradation, which induces the degradation of sulfur-containing compounds by photochemical sensitization. In these cases, the loss of RF can be used as a natural indicator for the degradation parameters, such as source and intensity of light, manipulation forms, heat treatment and storage time. Thus the determination of RF is necessary, either from the nutritional point of view or to quantity parameters in several dairy foods and beverages.

Milk can be considered as a colloidal suspension of proteins, butterfat, vitamins, salts and amino acids, in a medium with a high content of proteins, especially casein (over 80% w/w of the total milk protein)<sup>5</sup>, creating a complex system for chromatographic analysis.

The standard method for total RF determination in food is the AOAC fluorimetric method<sup>6</sup>, since RF has a fluorescence group. This involves a difficult and tedious procedure, including sample acidification and autoclaving. Furthermore, the proteins are removed by numerous pH adjustments, filtration steps and oxidation to remove fluorescent interferents. Thus several methods for

the determination of only RF alone in foods<sup>7</sup>, wine<sup>8</sup>, milk<sup>9,10,11</sup> and baker's yeast<sup>12</sup> or RF in association with other vitamins of the B complex in foods<sup>13,14</sup>, royal jelly<sup>15</sup> and mushrooms<sup>16</sup> have been developed.

Tetracyclines is a common name for a group of antimicrobials used to prevent or treat mastitis in cows, resulting in residues in the milk<sup>17,18</sup>. These antimicrobials can increase their natural fluorescence under alkaline conditions or by forming a fluorescent metal chelate with calcium ions<sup>19</sup>, which are present in high concentrations in milk. In this way, the presence of tetracyclines may interfere in the chromatographic analysis of RF in milk using a fluorescence detector<sup>20</sup>.

In this work we suggest a method for the determination of riboflavin in milk, in the presence of tetracyclines (oxytetracycline (OTC), doxycycline (DC) and tetracycline (TC)), using a simple procedure for the extraction of the milk proteins together with the direct conversion of the RF co-enzyme forms, such as flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) into free RF. Using this procedure, the total RF was quantified in different samples of whole and skimmed Brazilian bovine milk. The proposed method was also compared with a spectrofluorimetric method<sup>21</sup>.

## **2. Experimental**

### **2.1. Apparatus**

The chromatographic analysis was performed using a Waters 406 chromatograph, equipped with an isocratic pump, Rheodyne injector, with a sample loop of 20  $\mu$ L, a Shimadzu RF-10A fluorescence detector, and a Chromjet integrator. The chromatographic separation was carried out using a C<sub>8</sub> analytical column (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) (Varian) and a C<sub>8</sub> guard column (7.5 mm x 6 mm, 5  $\mu$ m) (Alltech). The fluorescence parameters were adjusted using excitation at 420 nm and emission at 530 nm. A Fanem centrifuge model 204-NR, was used during the extraction procedure.

In the spectrofluorimetric analysis, a Perkin-Elmer LS 55 Luminescence Spectrometer with a 10 mm quartz cuvette, was used at 23  $\pm$ 1 °C.

## 2.2. Reagents and solutions

The reagents used were at least of analytical grade, as follows: sodium acetate (Merck), calcium chloride (Reagen), EDTA (Reagen) and trichloroacetic acid (Baker). Riboflavin (98%, purity) was purchased from Sigma, and methanol (Mallinckrodt) was HPLC grade.

All solutions were prepared with deionized water obtained from a Millipore Milli-Q Académic System. The mobile phase consisted of an aqueous solution of sodium acetate (0.10 mol L<sup>-1</sup>), calcium chloride (35.0 mmol L<sup>-1</sup>) and EDTA (25.0 mmol L<sup>-1</sup>):methanol (65:35 v/v), filtered through 0.45 µm cellulose membrane filters (Millipore). A standard stock solution of 100 µg mL<sup>-1</sup> RF was prepared according to the AOAC procedure<sup>6</sup>, where 50.0 mg RF was dissolved in 0.02 mol L<sup>-1</sup> acetic acid and the volume made up to 500 mL, with the same solvent. The stock solution was stored in amber glass bottles in the dark, under refrigeration at 4 °C, for a maximum period of 2 weeks.

## 2.3. Samples

Nine different commercial brands of Ultra High Temperature (UHT) Brazilian milk were analyzed: five were skimmed milk and four were whole milk. All samples were purchased from local markets in Campinas/SP - Brazil.

## 2.4. Sample analysis

For milk protein extraction<sup>18</sup> 1.00 mL of milk sample was added to an Eppendorf tube, followed by 1.50 mL of 30 % (v/v) trichloroacetic acid (TCA). The tube was mixed and centrifuged for 10 minutes at 2560 g. The supernatant solution was filtered through a 0.45 µm membrane and 20 µL was injected into the chromatographic system, with an isocratic flow of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The HPLC analysis was carried out in triplicated.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Sample preparation

The extraction technique suggested by Furusawa<sup>17</sup> was used with some modification, such as a higher concentration of TCA. The addition of TCA to the

milk promotes an immediate precipitation of the milk proteins, producing a clear supernatant. Furthermore, TCA causes a direct acid hydrolysis of the RF co-enzyme forms, such as flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), into free RF, which is determined in the form of total RF by HPLC with fluorescence detector. This procedure works without any complex extraction or clean-up procedure such as oxidation<sup>4</sup> which may decrease the RF concentration in the sample by, approximately, 15% due to oxidative destruction<sup>22</sup>. It is advantageous due to the ease and rapidity in determining total RF in milk samples. The time necessary for sample preparation was 12 minutes, considering the centrifugation time.

### 3.2. HPLC conditions

The HPLC conditions were optimized in order to allow the separation of all compounds under study. The optimized mobile phase consisted of an aqueous solution-methanol (65:35 v/v), as described in item 2.2. The method has the advantage of being able to determine riboflavin in the presence of tetracyclines in milk, using a simple procedure of extraction and clean-up of the sample. Figure 2 shows the chromatograms of riboflavin standard and a sample of milk, obtained under the optimized chromatographic conditions. The milk extract did not present interferences, as can be verified in the chromatogram of the milk sample (Figure 2-b). The total time for the chromatographic analysis was 7 minutes.

### 3.3. Validation

The HPLC method was validated in the presence of tetracyclines, by evaluation of the following parameters: linearity, linear range, intra and inter-assay accuracy, detection and quantification limit and recovery.

The analytical curve was obtained with six concentrations of the RF standard solution (0.51 to 1.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The linear regression parameters were obtained by plotting peak area against riboflavin concentration, showing linearity in this range. The sensitivity was calculated as  $9.53 \cdot 10^5$  u.a  $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$  and the linearity, expressed as the regression coefficient, was 0.9980.

The quantification limit (LOQ) was determined through the following expression  $LOQ = 10 s_{y/x}/m$ , where  $s_{y/x}$  is the estimate of the standard deviation of the regression line and “m” the sensitivity (angular coefficient of the regression line). For the detection limit (LOD) a value of 3 was employed in the expression above.

The accuracy of the method was evaluated based on the recovery of known amounts of RF spiked in milk samples, with duplicate analysis. For the recovery test, the milk samples were fortified with 50% v/v of a solution  $1.12 \text{ mL}^{-1}$  of RF. The spiked samples were mixed for 5 hours in the dark, submitted to the extraction process and the RF concentration obtained compared with blank samples. The analytical parameters evaluated are shown in Table 1.

The precision of the method was evaluated by determination of the intra- and inter-assay precision. The intra-assay precision was determined by the evaluation of the RSD of 10 consecutive determinations, at a RF concentration of  $0.714 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A RSD value lower than 0.5 % was obtained. The inter-assay precision was evaluated by means of analysis of solutions containing 0.714, 0.918 and  $1.122 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  of RF on five consecutive days. All the determinations were carried out in triplicate and the RSD values varied from 0.2 to 0.5 %.

### **3.4. Riboflavin determination in milk**

The samples were analyzed using the optimized conditions of the experimental procedure, and the results obtained are summarized in Table 2. The common range of total RF concentration in milk<sup>23</sup> varies from 1.50 to  $1.80 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . As can be verified, all the results obtained were within the range from 1.49 to  $1.89 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , which indicate the samples analyzed were in the acceptable range for RF.

### **3.5. Comparison of the HPLC with a spectrofluorimetric method**

The results obtained for milk samples by the HPLC method were compared with those obtained applying spectrofluorimetric method, using a Perkin-Elmer LS 55 spectrofluorimeter and a standard addition method to perform the RF determination<sup>21</sup>. The same extracts of the milk samples were analyzed by the two methods and statistical analysis using the Student *t*-test showed no significant

difference ( $p \leq 0.05$ ) between the results obtained by the two methods. The results are presented in Table 2.

### 3.6. Analytical interferences

There is no report on the interference of tetracyclines in the determination of RF in milk. On the other hand, Carson and Breslyn<sup>20</sup> reported that RF interferes in the determination of tetracyclines by HPLC with fluorescence detector. In this work, the influence of three tetracyclines (OTC, DC and TC) on RF determination by HPLC was evaluated.

Brazilian legislation has established a maximum residue limit (MRL) of 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  for OTC and TC, alone or in combination. No MRL has been established for DC. The International Dairy Federation<sup>24</sup> recommends the same limits. Thus, the milk samples were spiked with 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each tetracycline and analyzed by the proposed HPLC method. It was verified that none of the tetracyclines overlapped the riboflavin peak, allowing for RF determination in their presence (Figure 3). In this way, the method was shown to be robust and specific for the determination of RF in whole and skimmed milk, even in the presence of the fluorescent tetracyclines.

## 4. Conclusions

The proposed method for the quantitative determination of riboflavin in whole and skimmed milk offers some advantages, such as simplicity, rapidity and low cost. The proposed method presents accuracy and precision, as shown by the low standard deviation and correlation to a comparative method. Furthermore, the methodology proved to be selective and robust when samples spiked with tetracyclines were analyzed. Consequently, the method can be applied to quantify RF in milk, being suitable for routine analysis.

## 5. Acknowledgements

The authors wish to thank the CNPq, FAPESP and FINEP/RECOPE for financial support. M. G. Trevisan and L. S. Silva Jr. are thankful to CNPq for their master's and doctorate fellowships, respectively.

## 6. References

1. Copperman, J. M.; Lopez, R.; In *Handbook of Vitamins*; Machlin, L. J., ed, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, 1991.
2. Cataldi, T. R. I.; Nardiello, D.; Scrano, L.; Scopa, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6643.
3. Bassete, R.; Fung, D. Y. C.; Mantha, V. R.; *Crit. Rev. Food Sci.* **1986**, *24*, 1.
4. Andres-Lacueva, C.; Mattivi, F.; Tonem, D.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 355.
5. Varnam, A. H.; Sutherland, J. P.; *Milk and Milk products - Technology, chemistry and microbiology*, Vol. 1, Chapman & Hall: London, 1996.
6. AOAC Official Method 981.15, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., Section 45.1.09, Whashington, 1995.
7. Vinas, P.; Balsalobre, N.; Lopez-Erroz, C.; Hernandez-Cordoba, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1789.
8. Gliszczynska-Swiglo, A.; Koziolowa, A.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 285.
9. Caelen, I.; Kalman, A.; Wahlstrom, L.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 137.
10. Ashoor, S. H.; Knox, M. J.; Olsen, J. R.; Deger, D. A.; *J. AOAC* **1985**, *68*, 693.
11. Rashid, I.; Potts, D.; *J. Food Sci.* **1980**, *45*, 744.
12. Gliszczynska-Swiglo, A.; Koziolowa, A.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 59.
13. Agostini, T. S.; Godoy, H. T.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1997**, *20*, 245.
14. Woollard, D. C.; Indyk, H. E.; *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 945.
15. Presoto, A. E. F.; Rios, M. D. G.; de Almeida-Muradian, L. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 136.
16. Esteve, M. J.; Farre, R.; Frigola, A.; Garcia-Cantabella, J. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1450.
17. Furusawa, N.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *839*, 247.
18. Severo Silva Jr., L.; *Ph.D. Thesis*, FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brazil, 2004.
19. Iwaki, K.; Okumura, N.; Yamazaki, M.; *J. Chromatogr.* **1992**, *623*, 153.
20. Carson, M. C.; Breslyn, W.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 29.
21. Trevisan, M. G.; *Master in Science Dissertation*, IQ - Universidade Estadual de Campinas, Brazil, 2003.

22. Woodrow, I. L.; Torrie, K. M.; Henderson, G. A.; *Inst. Can. Technol. Aliment.* **1969**, 2, 120; in Rashid, I.; Potts, D.; *J. Food Sci.* **1980**, 45, 744.
23. Hartman, A. M.; Dryden, L. P.; In *Vitamins in milk and milk products in Fundamentals of Dairy Chemistry*; Webb, B. H.; Johnson, A. H.; Alford, J. A.; eds.; 2nd ed., AVI: New York, 1983.
24. Honakanen-Buzalski, T.; Reybroeck, W.; *Antimicrobials*. In *Residues and Contaminants in milk and milk products*; International Dairy Federation ed; IDF General Secretariat: Brussels, 1997.

Table 1. Analytical parameters for the determination of riboflavin in milk.

Analytical Parameters	Results
Limit of detection ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.22
Limit of quantification ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.75
Linearity ( $r^2$ )	0.9980
Precision (%)	
Intra-assay	
( $c_1 = 0.714 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.5
Inter-assay	
( $c_2 = 0.714 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.5
( $c_3 = 0.918 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.3
( $c_4 = 1.122 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.2
Recovery (%)	92.2

Table 2. Results for determination of riboflavin in milk (average  $\pm$  s)\*

Samples	Riboflavin ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	HPLC	Fluorimetric Method
Whole sample 1	1.59 $\pm$ 0.03	1.56 $\pm$ 0.08
Whole sample 2	1.54 $\pm$ 0.02	1.61 $\pm$ 0.04
Whole sample 3	1.74 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.25
Whole sample 4	1.59 $\pm$ 0.06	1.69 $\pm$ 0.06
Skimmed sample 1	1.89 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.15
Skimmed sample 2	1.71 $\pm$ 0.02	1.64 $\pm$ 0.05
Skimmed sample 3	1.77 $\pm$ 0.02	1.68 $\pm$ 0.06
Skimmed sample 4	1.49 $\pm$ 0.01	1.46 $\pm$ 0.09
Skimmed sample 5	1.71 $\pm$ 0.02	1.85 $\pm$ 0.10

(\* ) s: estimative of the absolute standard deviation (n=3)

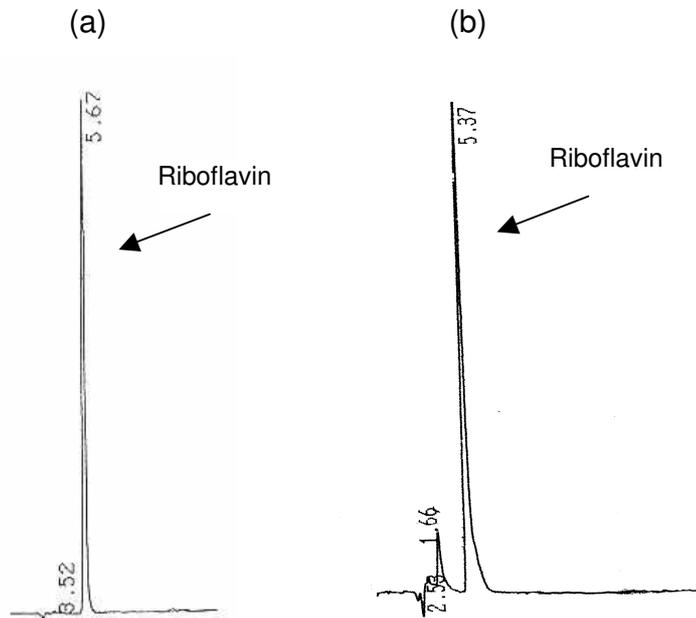


Figure 1. Chromatograms of (a) standard of riboflavin and (b) milk sample.

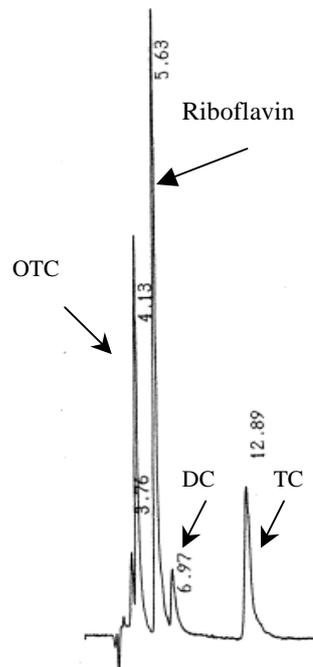


Figure 2. Chromatogram of riboflavin (RF) in milk in the presence of oxytetracycline (OTC), doxycycline (DC) and tetracycline (TC).

## CONCLUSÕES GERAIS

O método *FIA*, proposto para a determinação de tetraciclinas (OTC, DC e TC) em medicamentos de uso veterinário mostrou-se adequado para a determinação do princípio ativo de medicamentos de uso veterinário e, apesar de não ser seletivo para diferenciar as várias tetraciclinas, não compromete sua aplicabilidade, visto que estas não são veiculadas em associação nos medicamentos utilizados para o tratamento de mastite bovina. O método proposto apresenta vantagens por ser simples, dispensar o uso de solventes orgânicos, mostrar baixo custo dos reagentes e elevada frequência de amostragem.

A metodologia desenvolvida por CLAE, para a análise de oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina em leite, apresentou-se eficiente, considerando os parâmetros de validação (limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão), onde os valores encontrados nos limites de quantificação, ficaram abaixo do LMR exigido pela Legislação em vigor podendo, dessa forma, ser utilizada como método para detecção de resíduos de tetraciclinas, pois os mesmos são encontrados no leite em concentrações de traços.

Os resultados obtidos no estudo do processamento térmico, mostram que resíduos de oxitetraciclina, doxiciclina e tetraciclina, presentes no leite, não são inativados pelas condições normais de aquecimento. Portanto, procedimentos usuais de tratamento térmico do leite, não podem ser confiáveis para inativar resíduos de agentes antimicrobianos termoestáveis, como as tetraciclinas. A doxiciclina foi a menos estável sob as condições térmicas estudadas, ou seja, foi a tetraciclina que mais se degradou em todos os processamentos analisados (placa de aquecimento, forno microondas e fogão). A total inativação por tratamento térmico, dos resíduos de agentes antimicrobianos presentes no leite, só é atingida, sob condições de tempo/temperatura superiores às praticadas pela pasteurização e esterilização, como é o caso das tetraciclinas. Portanto, a melhor forma de garantir a segurança no consumo de leite e derivados, com relação aos resíduos de agentes antimicrobianos, é o controle na produção leiteira, onde esses medicamentos devem ser utilizados de maneira criteriosa e racional.

No processamento do iogurte, é possível concluir que os níveis máximos de concentrações avaliados de oxitetraciclina ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ), doxiciclina ( $1120 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e tetraciclina ( $600 \text{ ng mL}^{-1}$ ), adicionadas ao leite, não foram suficientes para inibir a atividade das bactérias ácido-láticas, requerendo apenas maior tempo de incubação, para a formação do coágulo. Com relação à vida-de-prateleira do iogurte, os resultados demonstraram que quanto maior o tempo de armazenamento, maior a porcentagem de degradação das tetraciclinas, no iogurte. Quanto à acidificação, foi observado que quanto maior a concentração das tetraciclinas adicionadas às amostras de leite, maiores valores de pH foram registrados, podendo ser explicado pela inibição que as tetraciclinas exercem frente aos fermentos lácteos havendo, assim, uma diminuição na produção de ácido láctico.

O método proposto para determinação de riboflavina em leite integral e desnatado, na presença de tetraciclinas, apresentou viabilidade pela sua rapidez na análise, economia, seletividade e, quando comparado com o método espectrofluorimétrico, não revelou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os resultados obtidos. Quando aplicado na análise de leite integral e desnatado, mostrou-se robusto na presença de substâncias fluorescentes como as tetraciclinas. Conseqüentemente, o método pode ser aplicado na determinação de riboflavina no leite, sendo apropriado para análises de rotina.

