

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

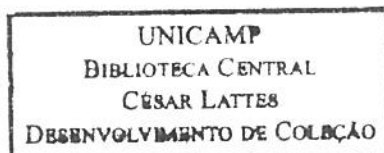
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS E
CLORANFENICOL EM MEL UTILIZANDO
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.**

**Gustavo Tayar Peres
Engenheiro de Alimentos**

**Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Orientador)**

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

**Campinas – SP
2009**



PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Gustavo Tayar Peres** aprovado pela Comissão Julgadora em 24 de julho de 2009.

Campinas, 24 de julho de 2009.

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Presidente da Banca

INIDADE BC
18 DA
10: 1415d
OBS. 82832
ROC. 16-148-09
REÇO 11,00
ATA 11/08/09
OD. TIT. 448383

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

T415d Peres, Gustavo Tayar
Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de
resíduos de tetraciclina, sulfonamidas e cloranfenicol em mel
utilizando técnicas cromatográficas / Gustavo Tayar Peres -- Campinas,
SP: [s.n.], 2009.

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

I. Antimicrobianos. 2. Apicultura. 3. Cromatografia líquida de
alta eficiência. 4. Mel. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Development of analytical methods for determination of tetracyclines,
sulfonimides and chloramphenicol residues in honey by chromatographic
techniques

Palavras-chave em inglês (Keywords): Antimicrobials, Apiculture, High performance liquid
chromatography, Honey

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes

Carol Hollingworth Collins

Sônia Cláudia do Nascimento de Queiroz

José Luiz Donato

Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Data da defesa: 24/07/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

E2-
R-1262

BANCA EXAMINADORA



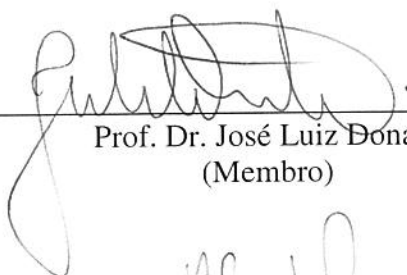
Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Orientador)



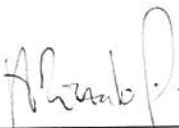
Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins
(Membro)



Profa. Dra. Sônia Claudia do Nascimento de Queiroz
(Membro)



Prof. Dr. José Luiz Donato
(Membro)



Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal
(Membro)

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador **Felix Guillermo Reyes Reyes**, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À professora **Susanne Rath** e aos **colegas do Laboratório de Química Analítica** do Instituto de Química da UNICAMP pela cooperação, sugestões e ensinamentos durante o curso.

Aos **funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos** pelo suporte durante todo o curso.

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

Aos **colegas do Laboratório de Toxicologia de Alimentos** pela amizade.

A minha esposa **Juliana** pela compreensão e apoio.

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

Muito obrigado!

Gustavo.

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8

CAPÍTULO 1

Considerações sobre o uso de medicamentos veterinários na apicultura e os métodos para determinação de seus resíduos no mel: Uma Revisão.....	11
Resumo.....	13
Abstract.....	15
Introdução.....	16
O Mel: definição e composição.....	17
O mercado do mel.....	18
A apicultura.....	20
Consequencias da presença de resíduos de antimicrobianos no mel.....	25
Legislação para os antimicrobianos.....	35
Metodos de análise de antimicrobianos no mel.....	38
Considerações finais.....	57
Referências Bibliográficas.....	58

CAPÍTULO 2

A HPLC method with fluorescence detection for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey	69
Abstract.....	71

Introduction.....	71
Experimental.....	74
Results and Discussion.....	78
Conclusions.....	87
References.....	87

CAPÍTULO 3

High performance liquid chromatography-tandem quadrupole-time of flight mass spectrometry for determination of sulfonamides and chloramphenicol in honey.....

93

Abstract.....	95
Introduction.....	96
Materials and methods.....	98
Results and Discussions.....	103
Conclusions.....	113
References.....	114

CONCLUSÕES GERAIS.....	120
-------------------------------	------------

ANEXO I	123
----------------------	------------

ANEXO II	127
-----------------------	------------

TABELAS

CAPÍTULO 1 - Considerações sobre o uso de medicamentos veterinários na apicultura e os métodos para determinação de seus resíduos no mel: uma revisão.

Tabela 1-	Tabela 1. Valores de LMR de antimicrobianos em diferentes matrizes de origem animal estabelecidos para o MERCOSUL.....	37
Tabela 2-	Métodos de HPLC para determinação de resíduos de antimicrobianos em mel.....	43

CAPÍTULO 2 - A HPLC method with fluorescence detection for the determination of tetracycline residues and evaluation of their stability in honey

Table I-	LOD, LOQ, working ranges, calibration curves parameters and correlation coefficients (r^2) for the linear regression.....	82
Table II-	Table II. Intra-day and Inter-day recoveries (%) and precisions (CV %) for the determination of OTC, TC and CTC in honey samples fortified in three different levels.....	83

CAPÍTULO 3 - High performance liquid chromatography-tandem quadrupole-time of flight mass spectrometry for determination of sulfonamides and chloramphenicol in honey

Table 1-	The m/z ratios for the most abundant ions calculated by the software based upon chemical formulas.....	106
Table 2-	LOD, LOQ and calibration curves parameters for SAs and CAP.....	107
Table 3-	Precision, determined as the mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and respective CV (%), and recovery (%) for the quantification of STZ, SMZ, SDM and CAP in fortified honey samples on three different occasions.....	108

FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Considerações sobre o uso de medicamentos veterinários na apicultura e os métodos para determinação de seus resíduos no mel: uma revisão.

Figura 1. Participação segundo as grandes regiões no total de mel produzido pelo Brasil em 2007	19
Figura 2. Quantidade de mel (em toneladas) exportada pelo Brasil entre os anos de 1998 e 2008	20
Figura 3. Estrutura do cloranfenicol	26
Figura 4. Estrutura da oxitetraciclina.	28
Figura 5. Estrutura das sulfonamidas	29
Figura 6. Estrutura da diidroestreptomicina (a) e estreptomicina (b)	31
Figura 7. Possíveis rotas de transmissão de antimicrobianos e de indução de resistência nos microrganismos em função do uso de antimicrobianos na produção de alimentos.	33

CAPÍTULO 2 - A HPLC method with fluorescence detection for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey.

Figure 1. (a) Blank sample with 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of doxycycline (IS) using pH 6.5 mobile phase; (b) honey sample fortified with 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC) with pH 6.5 mobile phase	79
Figure 2. Relative intensities of tetracycline fluorescence in the mobile phase using different combinations of excitation and emission wavelengths, compared to the reference binomial 390 - 512 nm.....	80

Figure 3. Determination of tetracyclines residue levels after fortification of a blank sample with standards at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 60 days of storage..... 84

Figure 4. Chromatograms of honey samples fortified with TCs at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and analyzed after 0 (a), 30 (b) and 60 days (c) of storage at ambient temperature. The peak before OTC is suspected of being epiOTC..... 85

Figure 5. Chromatograms of orange-flower (a), multi-flower (b) and eucalyptus (c) honey type samples analyzed by the method. 86

CAPÍTULO 3 - High performance liquid chromatography-tandem quadrupole-time-of flight mass spectrometry for determination of sulfonamides and chloramphenicol in honey.

Figure 1 - Chromatogram for a honey sample spiked with SDM, SMZ and STZ at 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and sulfamethoxazole (IS) at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 105

Figure 2 - Chromatogram for a honey sample spiked with CAP at 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and CAP D5 (IS) at 0.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 106

Figure 3 - Q-ToF-MS/MS spectra for the three SAs after CID fragmentation showing the precursor and products* ions used for confirmation. 110

Figure 4 - Mass spectra of the theoretical model for CAP (a), CAP standards solution (b) and a honey sample fortified (c). 111

Figure 5 - Mass spectrum for CAP standards showing the precursor (m/z 321.0085) and most abundant fragment ions: m/z 257.0243, m/z 194.0422 and m/z 152.0290..... 112

RESUMO GERAL

O uso de medicamentos veterinários na apicultura pode resultar na presença de resíduos de substâncias antimicrobianas no mel, causando problemas de saúde nos consumidores, resistência nos microrganismos patogênicos e entraves ao comércio do produto no mercado nacional e internacional. Portanto, o controle da presença de resíduos dos antimicrobianos no mel é importante para proteção da saúde do consumidor e desenvolvimento da apicultura no país. Neste trabalho, foram desenvolvidas metodologias analíticas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para determinação dos resíduos de tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol no mel. As tetraciclinas foram extraídas do mel por SPE e detectadas por fluorescência. As sulfonamidas e o cloranfenicol foram extraídos do mel simultaneamente, por meio de extração líquido-líquido e extração em fase sólida e os compostos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrometria de massas. Em ambos os métodos foram utilizadas para quantificação dos analitos curvas analíticas por padrão interno construídas pela fortificação do mel. Os limites de quantificação foram $25\mu\text{g kg}^{-1}$, $20\mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,3\mu\text{g kg}^{-1}$ para as tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol, respectivamente. Os métodos desenvolvidos foram validados e apresentaram desempenho satisfatório. A estabilidade das tetraciclinas no mel foi avaliada durante 60 dias de estocagem, confirmando a necessidade de monitoramento do mel.

Palavras-chave: antimicrobianos, apicultura, cromatografia líquida de alta eficiência, mel.

SUMMARY

The use of veterinary drugs in beekeeping can result in the presence of residues of antimicrobial substances in honey, causing health problems in the consumers, inducing resistance in the pathogenic microorganisms and impediments to the product commercialization on the national and international markets. Therefore, control of the presence of antimicrobial residues in honey is important for consumer protection and development of beekeeping in Brazil. In this work, analytical methods were developed using high performance liquid chromatography for determination of tetracyclines, sulfonamides and chloramphenicol in honey. The tetracyclines were extracted from honey by solid phase extraction and detected by fluorescence. Sulfonamides and chloramphenicol were extracted from honey simultaneously, combining liquid-liquid and solid phase extractions, and analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Quantification of the analytes was done by matrix matched calibration curves, with the use of internal standards. The quantification limits were $25\mu\text{g kg}^{-1}$, $20\mu\text{g kg}^{-1}$ and $0.3\mu\text{g kg}^{-1}$ for the tetracyclines, sulfonamides and chloramphenicol, respectively. The methods developed were validated and presented satisfactory performance. The stability of the tetracyclines in honey was evaluated during 60 days of storage and the results confirmed the necessity of residue monitoring.

Keywords: antimicrobials, apiculture, high performance liquid chromatography, honey.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o mel é um alimento obtido principalmente por meio da criação de abelhas em colméias artificiais, técnica denominada apicultura. A produção e comercialização de mel no Brasil possuem grande potencial de desenvolvimento quando comparadas a outros países como Argentina e China, considerando-se a extensão territorial e o clima. A apicultura no Brasil é uma atividade difundida por todo o país e caracteriza-se pela predominância de pequenos produtores que têm na comercialização de seus produtos uma importante, se não a principal, fonte de renda. Este quadro se contrapõe ao processo de concentração da produção agropecuária brasileira que ocorre atualmente por meio do chamado *agribusiness*. Assim, o desenvolvimento da apicultura no país possui não exclusivamente o caráter econômico de aumentar as receitas por meio da exportação, mas também um importante papel social de contribuir para a sustentabilidade da agricultura familiar e do pequeno produtor rural.

Entretanto, a apicultura, da mesma forma que outras produções agrícolas e pecuárias, está sujeita às doenças que prejudicam a produtividade e comprometem a rentabilidade da atividade. Entre as doenças que atingem as abelhas, destacam-se as de origem bacteriana como a Cria Pútrida Americana e a Cria Pútrida Européia (MESSAGE; JONG, 2002). No combate a estas doenças alguns criadores utilizam medicamentos veterinários com ação antimicrobiana, como os antibióticos. Historicamente, as principais substâncias utilizadas na apicultura para o controle das enfermidades de origem bacteriana são as tetraciclina, as sulfonamidas, a estreptomicina e o cloranfenicol, devido ao baixo custo e eficácia destes compostos. O uso de medicamentos veterinários na apicultura pode deixar resíduos no mel oriundo da colméia tratada e, apesar deste uso não ser permitido na maioria dos países, pesquisadores têm relatado a presença de resíduos de antimicrobianos, como o sulfatiazol e a tetraciclina, no mel (BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2009).

A presença de resíduos de antimicrobianos no mel implica em risco à saúde dos consumidores à medida que expõe estes aos perigos relacionados com o contato e a absorção destes compostos. O comitê misto de peritos em aditivos alimentares (JECFA) da Organização Mundial da Saúde (WHO) e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) não estabeleceu valores para a ingestão diária aceitável

(IDA) de cloranfenicol e sulfatiazol em decorrência dos dados toxicológicos disponíveis para avaliar a carcinogenicidade e os efeitos na reprodução, assim como pelo fato de o cloranfenicol ter apresentado genotoxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo* e o sulfatiazol ter induzido aumento no peso da tireóide de animais após o tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989, 2005). Outros efeitos adversos que podem estar relacionados ao uso de cloranfenicol são a diminuição na atividade da medula óssea, que é reversível e está relacionada à dose de exposição, e aplasia (anemia aplástica), efeito irreversível e que não depende da dose a qual o indivíduo é exposto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Outro problema relacionado com a presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos é o potencial de indução de resistência nos microrganismos patogênicos presentes no homem e no meio ambiente. A resistência aos antimicrobianos tem sido objeto de preocupação entre as autoridades mundiais de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceram programas de monitoramento e controle de resíduos de antimicrobianos em mel. Os programas estabeleceram limites máximos para os resíduos de tetraciclina e sulfonamidas em alimentos. O Programa do Ministério da Agricultura estabeleceu, também, limite máximo para resíduo de cloranfenicol no mel, mas este antibiótico não está permitido para uso na produção de alimentos no Brasil. Entretanto, a implantação das metodologias de análises de antimicrobianos em mel ainda não está consolidada (BRASIL, 2003, 2006, 2008).

Entre as técnicas utilizadas para determinação de resíduos de antimicrobianos em mel, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é, hoje, a mais explorada pelos pesquisadores. A evolução dos equipamentos e materiais utilizados no preparo de amostras é constante e tem permitido a determinação de resíduos em níveis de concentração de centenas de nanogramas por quilograma de amostra. Após o surgimento das fontes de ionização em pressão atmosférica, que possibilitaram o acoplamento de equipamentos de HPLC com espectrômetros de massas, a técnica hifenada de cromatografia líquida com

espectrometria de massas se tornou uma importante ferramenta na confirmação da identidade dos resíduos de antimicrobianos eventualmente presentes no mel (BALIZS; HEWITT, 2003).

Assim, considerando a importância da determinação de resíduos de medicamentos veterinários no mel, o presente estudo tem o objetivo de apresentar os principais aspectos relacionados ao uso de antimicrobianos na apicultura e desenvolver metodologias analíticas para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em mel utilizando a cromatografia líquida e alta eficiência em conjunto com técnicas de detecção por fluorescência e espectrometria de massas. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em mel.
2. Aplicação da metodologia desenvolvida para avaliar a estabilidade da oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em mel armazenado em condições de varejo.
3. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina em mel.
4. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de cloranfenicol em mel.

As metodologias e os dados obtidos nesta pesquisa poderão ser utilizados por laboratórios de análise de resíduos em alimentos na implantação das análises de rotina para determinação de resíduos de medicamentos veterinários no mel. Os métodos desenvolvidos poderão ser utilizados na prestação de serviços a produtores e exportadores, assim como para atendimento e expansão dos programas de controle e monitoramento estabelecidos pelos órgãos governamentais que objetivam o desenvolvimento da atividade apícola no país e a proteção da saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALIZS, G.; HEWITT, A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.492, p.105-131, 2003.
- BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. Residues of antibiotics and sulfonamides in honeys from Basque Country (NE Spain), **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89 p. 63-72, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n.253 de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal - PAMVet. **Diário Oficial da União**, 18 set. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal- PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. 2006. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>>. Acesso em 20 jun. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.9 de 10 de abril de 2008. Publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2007, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007. **Diário Oficial da União**, 17 abr. 2008.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Decisão da Comissão, de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, L. 221, p. 8-36, 2002b.
- MESSAGE, D.; JONG, D. Dispersão Internacional da bactéria *Paenibacillus larvae*, causadora da cria pútrida americana através da comercialização de mel. Disponível em: <<http://www.apacame.com.br>>. Acesso em 23 ago. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives. **Thirty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 25, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives. **Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 33, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneve, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>. Acesso em 14/11/2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **Sixty-second meeting of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 53, 2005.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA APICULTURA E OS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE SEUS RESÍDUOS NO MEL: UMA REVISÃO.

**Este capítulo foi publicado na forma de dois artigos na
Revista Brasileira de Toxicologia
(Anexos I e II)**

Considerações sobre o uso de medicamentos veterinários na apicultura e os métodos para determinação de seus resíduos no mel: uma revisão.

Resumo

A apicultura está sujeita ao ataque de pragas que prejudicam a produtividade do apiário e, conseqüentemente, a lucratividade do produtor. Para combatê-las, são utilizadas técnicas de manejo e a aplicação de antimicrobianos, cujos resíduos podem estar presentes no mel, expondo os consumidores aos perigos conseqüentes da sua ingestão. O monitoramento dos resíduos de antimicrobianos no mel é fundamental para a proteção da saúde do consumidor e para o desenvolvimento do mercado internacional deste produto. Esta revisão teve por objetivo apresentar as principais substâncias antimicrobianas utilizadas na apicultura para o controle das enfermidades bacterianas, seus aspectos toxicológicos e de legislação, assim como as conseqüências da presença de seus resíduos no mel. Uma revisão das metodologias analíticas utilizadas para a determinação da presença de resíduos destes antimicrobianos no mel, com destaque para a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas, também é apresentada.

Palavras chave: medicamentos veterinários, mel, antimicrobianos, apicultura, HPLC, espectrometria de massas.

**Considerations about the use of veterinary drugs on the apiculture and the methods
for residues determination in honey: a review.**

Abstract

Apiculture is subject to attacks by plagues, which hurt productivity of the apiary and, consequently, the profit of the producer. For disease control, management techniques of the beehives and antimicrobial substances are applied. Residues of these substances can be present in honey, exposing the consumer to hazards in consequence of its ingestion. The monitoring of antimicrobials residues in honey is essential to protect consumers and to develop the international trade. The aim of this work was to present a review about the main antimicrobial substances used for bacterial disease control in the apiculture, its toxicological aspects and regulation. It is also discussed the consequences of the presence of veterinary drugs residues in honey related to public health and trade. Finally, the analytical methodologies that have been used to evaluate the presence of residues of the antimicrobials in honey are reviewed, with emphasis in liquid chromatography and mass spectrometry.

Keywords: veterinary drugs, apiculture, honey, antimicrobials, apiculture, chromatography, mass spectrometry.

Introdução

A apicultura no Brasil tem apresentado crescimento nos últimos anos, consolidando-se como uma atividade geradora de renda e empregos, principalmente nas áreas rurais do país. O País possui potencial para se tornar um grande produtor e exportador de mel e de outros produtos apícolas. Como em outras atividades agropecuárias, a apicultura está sujeita ao ataque de pragas e doenças que prejudicam a produtividade do apiário e, conseqüentemente, a lucratividade do produtor. Entre as enfermidades mais prejudiciais, destacam-se as de origem bacteriana como a Cria Pútrida Européia (EFB) e a Cria Pútrida Americana (AFB). Para combatê-las, a medicina veterinária utiliza técnicas de manejo das colméias e a aplicação de antimicrobianos, sendo a oxitetraciclina, o cloranfenicol e o sulfatiazol as substâncias mais comumente utilizadas. Entretanto, os resíduos destes medicamentos podem estar presentes no mel, expondo os consumidores e a população aos perigos conseqüentes da ingestão e uso indiscriminado de antimicrobianos. Para reduzir este risco é importante fazer o monitoramento dos níveis de resíduos destas substâncias no mel por meio de programas de controle e monitoramento. As determinações de resíduos de antimicrobianos em mel são realizadas através de técnicas analíticas, dentre as quais se destacam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a acoplação desta com a Espectrometria de Massas (LC-MS). Este trabalho teve como objetivo abordar as relações entre apicultura, substâncias antimicrobianas e as conseqüências da presença de resíduos destas substâncias no mel. Também é apresentada uma revisão das metodologias analíticas que têm sido utilizadas para determinação de resíduos dos antimicrobianos no mel, com ênfase nas técnicas de HPLC e LC-MS, assim como os principais procedimentos de preparo das amostras.

O Mel: definição e composição

Segundo a Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprovou o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel”, este é definido como: “o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colméia” (BRASIL, 2000).

A composição do mel varia com a espécie de abelha produtora, a origem da matéria prima coletada pelas abelhas e o ambiente onde a colméia está localizada. Com relação a sua composição, a Instrução Normativa n. 11 do MAPA define, de maneira geral, que “o mel é uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém, ainda, uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração” (BRASIL, 2000).

MOREIRA e DE MARIA (2001) revisaram estudos sobre a composição de méis no Brasil, EUA, Canadá, Hungria e Espanha, confirmando que frutose e glucose são os componentes majoritários, compondo de 65 a 85 % dos sólidos totais. LEITE et al. (2000) determinaram os níveis de dissacarídeos e trissacarídeos em méis de 14 estados brasileiros, obtendo teores médios de 9,0 % e 1,1 %, respectivamente. QIU et al. (1999) analisaram a composição do mel em 74 amostras, provenientes de 11 países, por espectroscopia de

infravermelho e determinaram um valor médio de umidade de 18,1%. No Brasil, um estudo determinou os teores de água em amostras de mel de diferentes origens botânicas separadas de acordo com as grandes regiões geográficas. As médias dos valores determinados para cada região variaram entre 17,4 % e 19,2 % (COSTA et al, 1999).

O mercado do mel

A venda do mel para os entrepostos ou varejistas, nacionais e internacionais, e seu uso como ingrediente nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica são as principais formas de comercialização do produto *in natura*.

A produção de mel no Brasil em 2003 ultrapassou 30 mil toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2003), com crescimento em torno de 25% em relação a 2002, quando foram produzidas, aproximadamente, 24 mil toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002). Em termos comparativos, no ano de 2003, a Argentina produziu cerca de 85 mil toneladas e a China 273 mil toneladas (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2004). Já em 2007, a produção brasileira foi de 34,5 mil toneladas, com destaque para os estados da região sul e nordeste do país conforme apresentado na Figura 1 que ilustra a distribuição da produção de mel no Brasil segundo as grandes regiões. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007).

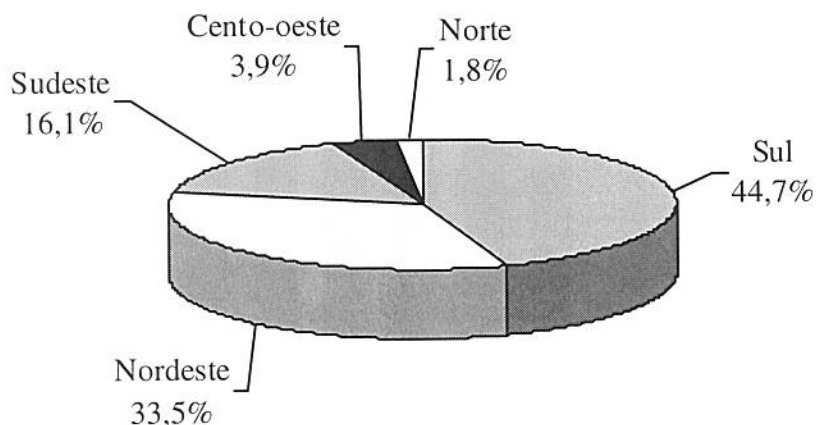


Figura 1. Participação segundo as grandes regiões no total de mel produzido pelo Brasil em 2007 (FONTE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007).

A exportação de mel tem aumentado significativamente, inserindo o Brasil no mercado mundial. Entre os fatores que têm influenciado este crescimento, destacam-se: desenvolvimento das técnicas de produção, aumento da produtividade e da qualidade do produto e a criação de associações e cooperativas de produtores que proporcionam acesso ao mercado internacional.

Na Figura 2 são apresentados dados sobre a exportação de mel pelo Brasil.

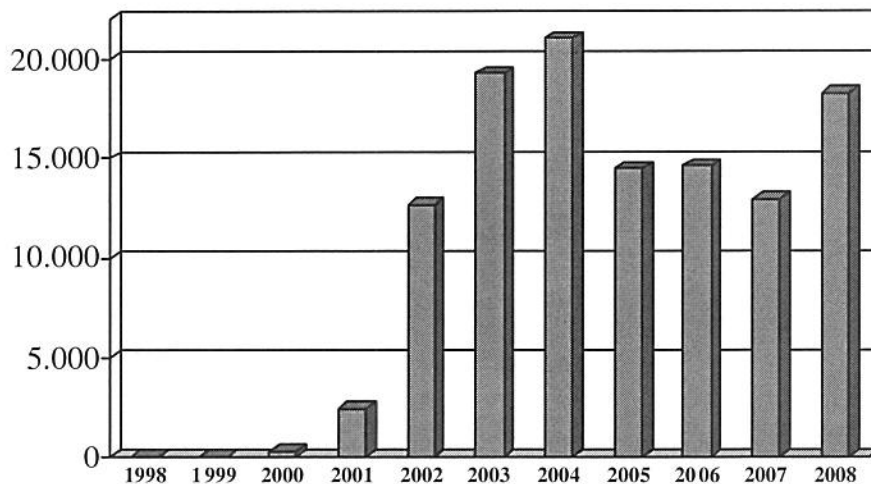


Figura 2. Quantidade de mel (em toneladas) exportada pelo Brasil entre os anos de 1998 e 2008 (FONTE: BRASIL, 2009).

As quantidades de mel importadas pelo Brasil decrescem desde 1995, quando totalizaram 254 toneladas. Neste período, os principais exportadores de mel para o Brasil foram o Uruguai, a Argentina e os Estados Unidos. Em 2008 não houve registro de importação de mel (BRASIL, 2009).

A apicultura

Apicultura é a criação de abelhas em confinamento sob controle do homem, utilizando métodos e equipamentos criados para melhor explorar as capacidades naturais deste inseto. Atualmente no Brasil, a principal espécie utilizada é a abelha européia africanizada, resultado do cruzamento entre a abelha européia (*Apis mellífera*), introduzida no país pelos jesuítas nos séculos XVIII e XIX, e as abelhas africanas (*Apis mellífera adansoni* e *Apis mellífera capensis*), introduzidas na segunda metade do século XX. Além do mel, outros

produtos são obtidos da apicultura como a cera, a geléia real, o pólen, a própolis e a apitoxina (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003).

Recentemente, a apicultura tem apresentado crescimento no Brasil por ser uma atividade rentável e com relativa facilidade de implantação. Apesar de exigir algum conhecimento técnico por parte do produtor, as tecnologias utilizadas são simples e baratas, possibilitando que as propriedades rurais, das mais diversas regiões do país, pratiquem essa atividade. A criação de abelhas pode ser realizada em paralelo às outras atividades da propriedade, gerando um complemento de receita para o proprietário rural e contribuindo para a sustentabilidade do homem no campo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003).

As principais enfermidades bacterianas na apicultura

A Cria Pútrida Americana (American Foul Brood - AFB) e a Cria Pútrida Européia (European Foul Brood - EFB) são doenças bacterianas altamente contagiosas que atingem as abelhas (WILSON, 2000). Mesmo com o controle através da utilização de antimicrobianos e aplicação das práticas de manejo, as bactérias responsáveis por estas doenças espalharam-se por diversas regiões do mundo, sendo a comercialização do mel contaminado a principal forma de sua disseminação (MESSAGE; DE JONG, 1999).

Cria Pútrida Americana (AFB)

A AFB é uma das doenças mais destrutivas na apicultura, sendo causada pelo *Paenibacillus larvae*, uma bactéria gram positiva, microaerofílica e esporulada (MIYAGI et al., 2000). O ciclo parasitário é iniciado quando as larvas das abelhas ingerem mel

contaminado com esporos da bactéria que germinam no intestino das mesmas e, sob forma vegetativa, invadem seu sistema hemolinfático. As células bacterianas se reproduzem até causar a morte da larva, quando entram em processo de esporulação criando a principal forma de disseminação da doença. O esporo dormente é resistente ao calor, fato que impede sua destruição em condições de aquecimento que não promovam a degradação do mel (STEINKRAUS; MORSE, 1996).

Quando as abelhas operárias limpam os alvéolos com as larvas mortas, os esporos são espalhados por toda a colméia e outras larvas são contaminadas de maneira análoga. O mel produzido também é contaminado e passa a ser uma fonte de transmissão para outras larvas e colméias. No Brasil, a AFB já foi detectada em apiários do sul do país (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2003). A contaminação ocorreu, provavelmente, porque os apicultores alimentaram as abelhas com mel e pólen importados, que estavam contaminados com a bactéria.

Cria Pútrida Européia (EFB)

A EFB é causada pelo *Melissococcus pluton*, uma bactéria sob forma de cocos, não esporulada, gram positiva, sem motilidade e anaeróbia ou microaerofílica (EUZÉBY, 2002).

O mel contaminado com a respectiva bactéria pode ser utilizado pelas operárias como alimento das larvas. Assim, a bactéria se reproduz no intestino da larva até provocar a morte desta. Na limpeza das células da colméia, as operárias distribuem a bactéria pela colônia e, conseqüentemente, para o mel, que pode contaminar equipamentos nos entrepostos e servir, involuntariamente, como alimento para abelhas de outras colméias.

Assim como na AFB, o tratamento térmico para eliminar a bactéria causadora da EFB é incompatível com a estabilidade do mel (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2002).

A utilização de antimicrobianos na apicultura

O uso de antimicrobianos é uma importante ferramenta da medicina veterinária para a criação de animais utilizados na produção de alimentos. Atualmente, os antimicrobianos são usados para tratar infecções (uso terapêutico), prevenir o aparecimento de infecções (profilático) e melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Até meados da década de 40, a forma mais utilizada para controlar a dispersão de doenças na apicultura era queimar as colméias e utensílios de madeira e ferver outros materiais utilizados nos apiários e entrepostos. Apesar de sua eficácia, esta técnica causa sérios prejuízos financeiros ao apicultor, pois exige aquisição de novos equipamentos e implica em redução da capacidade de produção. Após a segunda guerra mundial, o combate às doenças utilizando-se medicamentos do tipo “sulfas”, derivados da sulfanilamida, ganhou repercussão entre produtores e pesquisadores da apicultura. O antibacteriano mais utilizado desde essa época é o sulfatiazol. No final dos anos 50, foi introduzida a oxitetraciclina, que se revelou um potente agente no controle da AFB e EFB, enquanto que o sulfatiazol é eficaz somente no controle da EFB (CLAY, 2000; WILSON, 2000). Em alguns países, uma combinação destas substâncias é utilizada (DIAZ et al., 1990; SALINAS et al., 1991).

Mesmo tendo seu uso veterinário proibido para produção de alimentos na maioria dos países devido ao seu potencial carcinogênico, o cloranfenicol, antibiótico da classe dos anfenicóis, também tem sido objeto de investigações desde que resíduos desta substância foram detectados em méis e outros produtos destinados à alimentação humana (HORMAZÁBAL; YNDESTAD, 2001; MARTIN, 2003; VERZEGNASSI et al., 2003). O seu uso não foi descontinuado devido, provavelmente, ao baixo custo do produto e seu amplo espectro de ação antimicrobiana.

O uso de estreptomicina para a prevenção de AFB e EFB não é autorizado nos Estados Unidos e na União Européia. Entretanto, a presença deste antimicrobiano em méis comercializados nesses países foi relatada por alguns autores (MARTIN, 2003; MUTINELLI, 2003). ORTELLI et al. (2004) afirmaram que na China, o maior exportador de mel do mundo, a estreptomicina e o cloranfenicol são os antimicrobianos preferenciais para utilização na apicultura.

Pesquisadores têm testado outros antimicrobianos para controle das doenças de origem bacteriana que ocorrem nas abelhas, sendo a tilosina (PENG et al., 1996) e o cloreto de lincomicina (FELDLAUFER et al., 2001) substâncias apontadas como alternativas eficientes no tratamento das variedades resistentes.

Em trabalho de revisão sobre a contaminação de produtos apícolas, BOGDANOV (2006) destacou que os antibióticos, como as tetraciclina, as sulfonamidas e os compostos acaricidas, como o cimiazol e o fluvalinato, são os principais contaminantes do mel devido às práticas apícolas para controle de doenças.

A falta de informação da maioria dos apicultores aliada à grande extensão territorial do Brasil, e conseqüente dificuldade de orientação e controle pelas autoridades

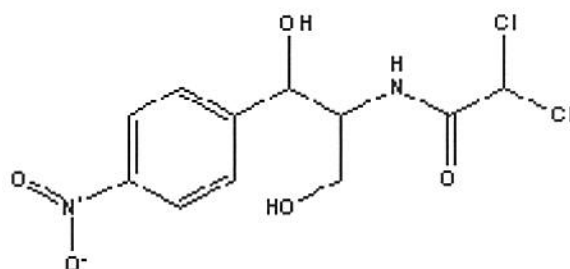
competentes, podem transformar em pânico qualquer notícia sobre a disseminação da Cria Pútrida Americana e/ou Européia no Brasil, levando ao uso indiscriminado de antimicrobianos pelos apicultores brasileiros com a intenção de prevenir o aparecimento e desenvolvimento das doenças. No entanto, não há, até o momento, dados sobre a utilização de antimicrobianos pelos produtores brasileiros. Existem no Brasil, atualmente, diversos medicamentos veterinários que utilizam como princípios ativos os antimicrobianos estudados nesta revisão. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 41 medicamentos de uso veterinário com estreptomicina, 17 com diidroestreptomicina, 19 com sulfametazina, 1 com sulfatiazol, 4 com sulfadimetoxina, 46 com oxitetraciclina, 8 com tetraciclina e 7 com clortetraciclina. No entanto, não há indicação de uso destes produtos na apicultura. Não existem produtos registrados que utilizam o cloranfenicol (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL, 2009).

Conseqüências da presença de resíduos de antimicrobianos no mel

Aspectos toxicológicos

Cloranfenicol

O cloranfenicol (Figura 3), inicialmente denominado cloromicetina, obtido a partir de culturas do *Streptomyces venezuelae*, foi o primeiro antibiótico a ser produzido sinteticamente em escala industrial, logo após a sua estrutura ser estabelecida (CORBETT, 1973).



Massa molar = 323,14 g

Figura 3. Estrutura do cloranfenicol.

Em humanos, 90% do cloranfenicol administrado é biotransformado no fígado por conjugação com o glucoronídeo e excretado pelos rins, sendo os outros 10% eliminados na forma ativa na urina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

O cloranfenicol apresentou genotoxicidade em alguns sistemas de testes *in vivo* e *in vitro*. Mas, apesar da dificuldade de avaliação da menor concentração capaz de causar lesões genéticas em humanos, acredita-se que esta concentração seja em torno de 1000 vezes superior às concentrações sanguíneas que poderiam resultar da ingestão de alimentos com resíduos do antimicrobiano. Os efeitos adversos mais graves que podem ser provocados pelo cloranfenicol em humanos estão relacionados com sua capacidade de causar disfunção na atividade da medula óssea e aplasia (anemia aplástica), a qual é irreversível e independente da dose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994). Na última avaliação toxicológica do cloranfenicol realizada pelo Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), em 2004, não foi possível estabelecer um valor de Ingestão Diária Aceitável (IDA) devido à falta de dados para avaliar a carcinogenicidade e

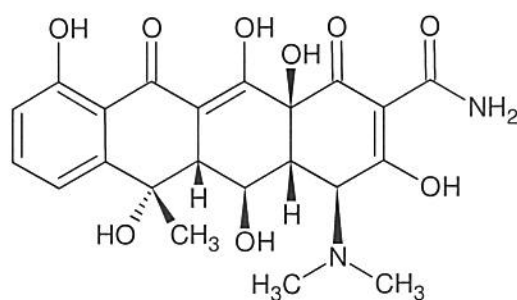
efeitos na reprodução, assim como pelo fato de o composto ter apresentado genotoxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Conseqüentemente, o Comitê também não estabeleceu limites máximos de resíduos para cloranfenicol em alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

BOGUSZ et al. (2004) afirmaram que o uso do cloranfenicol, em especial na China e outros países do sudeste asiático, pode estar relacionado aos altos índices de incidência de aplasia detectados nestes países: 2 casos em 100 mil habitantes na China e 3,7 casos em 100 mil habitantes na Tailândia, contra 0,2 casos em 100 mil habitantes na Europa.

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) relatou que as evidências sobre a carcinogenicidade em humanos relacionadas à exposição ao cloranfenicol são limitadas. Entretanto, a agência reportou que esta substância pode induzir a anemia aplástica e que esta condição, em alguns casos relatados, foi sucedida por leucemia. A IARC concluiu que o antimicrobiano é, provavelmente, carcinogênico em humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1990).

Oxitetraciclina

A oxitetraciclina (Figura 4) possui ação sobre bactérias gram positivas e gram negativas. O efeito bacteriostático é reversível e ocorre devido a sua interferência na síntese protéica (OKA et al., 2000).



Massa molar = 460,44 g

Figura 4. Estrutura da oxitetraciclina.

Estudos de farmacocinética demonstraram que as tetraciclina não são absorvidas completamente pelo trato gastrointestinal. No caso da oxitetraciclina, a taxa de absorção para uma condição de estômago vazio é de, aproximadamente, 60% do total ingerido. A absorção é afetada pela ingestão conjunta de produtos lácteos, hidróxido de alumínio, bicarbonato de sódio e sais de cálcio e magnésio devido à formação de quelatos e alterações no pH estomacal. Após a absorção, a oxitetraciclina é largamente distribuída pelo corpo e eliminada, principalmente, na urina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

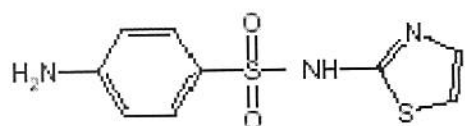
Durante tratamento com administração oral, diversos efeitos tóxicos têm sido relatados como irritação gastrointestinal, azia, desconforto abdominal, náusea, vômito e diarreia. Após o tratamento de infecções com oxitetraciclina, foi observado o desenvolvimento de hipersensibilidade em alguns pacientes que apresentaram uma forte reação alérgica quando expostos novamente ao antimicrobiano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

O impacto da oxitetraciclina na microflora intestinal foi estudado e a dose na qual não se observou efeito sobre a mesma foi de $33 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia. De

acordo com os resultados dos estudos toxicológicos e dos efeitos microbiológicos da oxitetraciclina, foi estabelecido pelo JECFA um valor de IDA para o grupo de tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), juntas ou isoladas, de 0-0,03 mg kg⁻¹ de peso corpóreo.

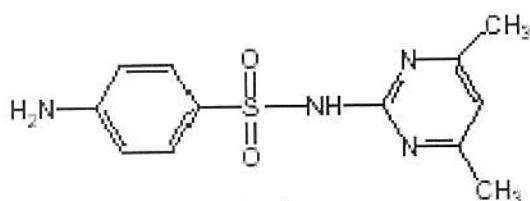
Sulfatiazol

O metabolismo das sulfonamidas (Figura 5) em animais ocorre através da conjugação com ácido glucurônico, remoção do grupo amino na posição *para*, hidroxilação do anel e conjugação com os produtos da hidroxilação.



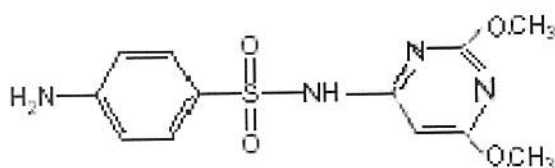
Sulfatiazol

Massa molar = 255,32 g



Sulfametazina

Massa molar = 278,32 g



Sulfadimetoxina

Massa molar = 310,33 g

Figura 5. Estrutura das sulfonamidas.

Os resultados de estudos com cães apresentaram aumento no peso da tireóide dos animais após tratamento com o sulfatiazol. Na sua avaliação, o comitê do JECFA considerou os estudos toxicológicos com o sulfatiazol insuficientes, principalmente em relação aos efeitos hormonais do sulfatiazol, e não estabeleceu um valor de IDA para este antimicrobiano. O comitê também julgou insuficientes os dados sobre a genotoxicidade do antimicrobiano em mamíferos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989). O Grupo Mercado Comum (GMC) estabeleceu a IDA de $0\text{-}50\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ referente ao somatório das sulfonamidas (GRUPO MERCADO COMUM, 2000).

Estreptomicina

A estreptomicina e diidroestreptomicina (Figura 6) pertencem à classe dos aminoglicosídeos, antibióticos que exibem atividade contra o crescimento de bactérias aeróbias gram positivas e gram negativas, através da inibição irreversível da síntese protéica bacteriana.

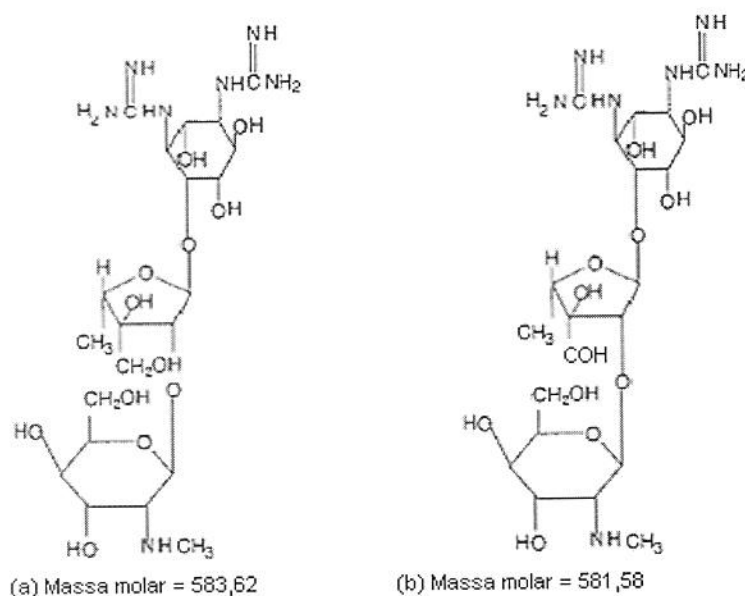


Figura 6. Estrutura da diidroestreptomicina (a) e estreptomicina (b).

A estreptomicina também é utilizada como medicamento veterinário e, dessa forma, seus resíduos podem ser encontrados em carne, fígado, rim e leite dos animais tratados com este antibiótico, assim como no mel. É um antimicrobiano de baixo custo e potencialmente tóxico para os rins, ouvido, laringe e garganta. Em geral, a concentração de estreptomicina no alimento não tem efeito tóxico agudo, mas numerosos casos de hipersensibilidade alérgica, associados à exposição à estreptomicina, foram evidenciados durante os últimos anos, podendo produzir severas erupções na pele (EDDER et al., 1999).

A absorção da estreptomicina pelo trato gastrointestinal é muito baixa. Estudos relataram que, após a administração oral do antimicrobiano, aproximadamente 1% do total da dose ingerida foi detectado no sangue dos pacientes sendo posteriormente eliminada na urina. Entre 60 e 100% do total administrado é eliminado nas fezes sem qualquer alteração. Em geral, os antimicrobianos pertencentes à família dos aminoglicosídeos não são

metabolizados pelos humanos. Em um estudo de teratogenicidade, foi comparada a incidência de má formação congênita em recém nascidos, cujas mães receberam tratamento para tuberculose com estreptomicina, e a incidência em um grupo controle, que não recebeu tratamento. Nenhuma diferença entre os grupos foi identificada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Devido às semelhanças entre a diidroestreptomicina e a estreptomicina, com relação à estrutura, às propriedades farmacocinéticas, aos perfis toxicológicos e aos espectros de ação antimicrobiana, dados sobre as duas substâncias foram considerados pelos peritos do JECFA para determinação do valor para a IDA. Assim, o comitê estabeleceu um valor de 0 - 0,05 mg kg⁻¹ de peso corpóreo por dia. O valor refere-se à soma dos resíduos das duas substâncias e está baseado em avaliações da toxicidade da estreptomicina e diidroestreptomicina, sendo que no estudo mais sensível sobre o efeito tóxico das substâncias foi estabelecido o nível de 5 mg kg⁻¹ de peso corpóreo por dia para administração oral de diidroestreptomicina em ratos durante um período de dois anos, sem que fossem observados efeitos adversos. Para extrapolação dos dados para humanos, foi utilizado um fator de segurança de 100 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos

Nas últimas décadas, o uso crescente de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto veterinária, tem causado uma seleção genética de bactérias resistentes aos medicamentos. Algumas bactérias resistentes que emergiram dos alimentos e animais podem causar infecções em humanos, enquanto que outras podem transmitir os genes que determinam a resistência para bactérias patogênicas aos humanos, sendo que este efeito

irreversível pode ser induzido mesmo quando aquelas estão expostas a baixos níveis de antimicrobianos (JORGENSEN; HALLING-SORENSEN, 2000). A relação entre o uso de antimicrobianos em animais destinados à produção de alimentos e o isolamento de bactérias resistentes em humanos pode ser demonstrada por diversas linhas de pesquisa como a investigação de surtos, as investigações epidemiológicas e os estudos de campo, além dos os casos reportados na literatura, das associações entre tempo e locais de utilização de antimicrobianos e a subtipagem molecular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Na Figura 7 é apresentado um esquema das possíveis relações entre o uso de medicamentos veterinários, a presença de seus resíduos no ambiente e em alimentos para consumo humano, o desenvolvimento de resistência nos microrganismos e as rotas de veiculação aos humanos.

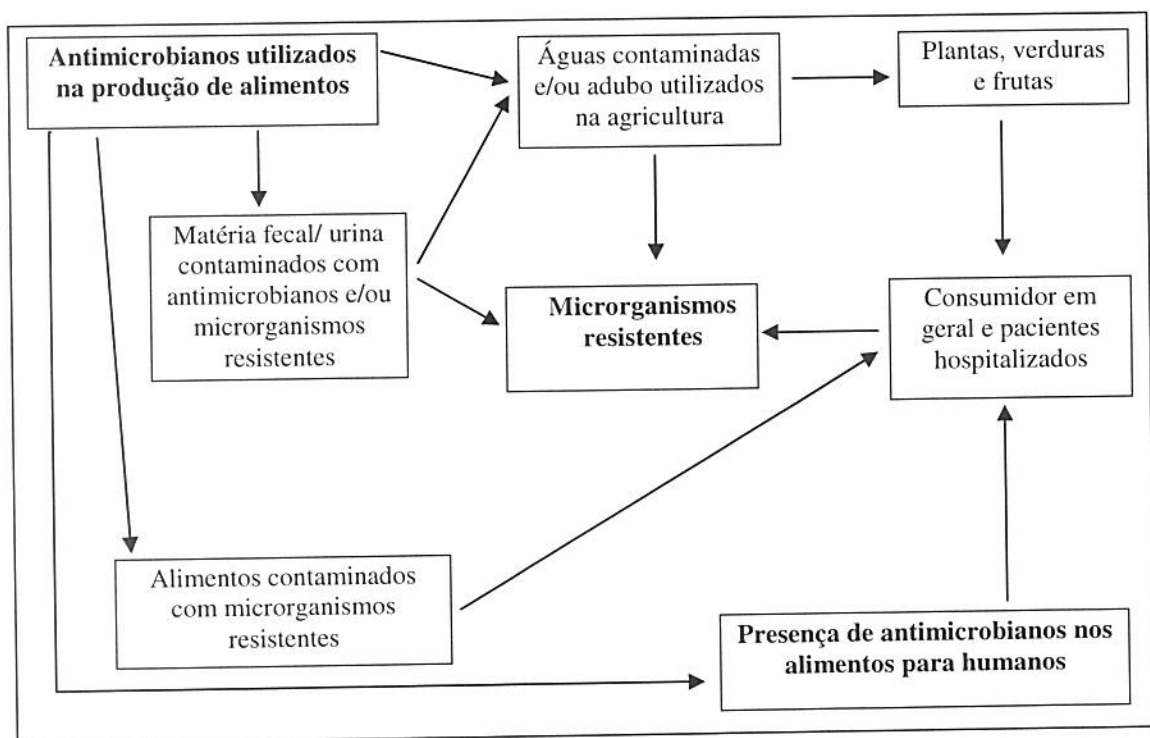


Figura 7. Possíveis rotas de transmissão de antimicrobianos e de indução de resistência nos microrganismos em função do uso de antimicrobianos na produção primária de alimentos.

Como conseqüências do aparecimento de bactérias resistentes pode haver a diminuição de eficácia dos tratamentos, aumento da severidade da infecção, aumento do período de tratamento e o uso de antimicrobianos mais tóxicos e caros.

No início desta década, foram relatadas novas infestações da Cria Pútrida Americana nos Estados Unidos (MIYAGI et al., 2000), Argentina (CLAY, 2000) e Canadá (CLAY, 2000; NELSON & MELATHOPOULOS, 2002), devido ao aparecimento de variedades da bactéria *Paenibacillus larvae* resistentes a oxitetraciclina.

Aspectos comerciais

No mercado globalizado de hoje, as barreiras não alfandegárias têm sido utilizadas como uma forma de protecionismo e de regulação de preços. Recentemente, ocorreram os episódios da soja exportada para a China com resíduos de fungicidas (AGRONOTÍCIAS, 2004), bem como, os focos de febre aftosa no Pará e Mato Grosso do Sul, que geraram embargos às exportações de carnes brasileiras para diversos países (SILVA; MIRANDA, 2009). Fatos como estes prejudicam a imagem do Brasil como fornecedor de produtos de qualidade e livres de contaminações físicas, químicas ou biológicas com conseqüentes prejuízos a cadeia produtiva.

Da mesma forma, a presença de resíduos de antimicrobianos no mel, em desacordo com as legislações dos países importadores, pode causar empecilhos às exportações brasileiras. Cabe ressaltar que a Comunidade Européia suspendeu temporariamente, no início de 2002, a importação de produtos de origem animal da China, tanto para consumo humano quanto animal. O fato ocorreu devido à contaminação de alguns produtos aquícolas e do mel com cloranfenicol (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002a).

Em relação à importação de mel, a principal preocupação das autoridades é com a possível contaminação dos apiários brasileiros. Nos países que exportaram mel para o Brasil até 2007, dois deles fronteiriços (Argentina e Uruguai), já foram relatadas infestações das bactérias responsáveis por doenças como a Cria Pútrida Americana e Européia que, após causarem prejuízos à apicultura dos respectivos países, têm sido controladas com o uso de antimicrobianos (ALIPPI; AGUILAR, 1998; PICCINI; ZUNINO, 2001). A importação sem as devidas medidas de controle sanitário apresenta riscos para o consumidor nacional pela possível comercialização de mel contaminado com resíduos de antimicrobianos. Além disso, os apiários brasileiros ficam sujeitos à contaminação pelas bactérias e/ou seus esporos presentes, dispersando as doenças no território nacional. O MAPA publicou em 2008 a Instrução Normativa Nº 18 de oito de abril de 2008 que estabelece os requisitos zoossanitários para a importação de abelhas rainhas e produtos apícolas destinados aos Estados Partes, internalizando a Resolução GMC - MERCOSUL nº 23/2007. Esta Instrução Normativa estabelece que os produtos importados devam ser provenientes de apiários onde não foram reportados casos das doenças no período de 30 dias e 12 meses anteriores a exportação para a EFB e AFB, respectivamente (BRASIL, 2008a).

Legislação para os antimicrobianos

Programas de controle e monitoramento

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador do setor de alimentos no Brasil, criou em 2003 o Programa Nacional de Análise de Resíduos de

Medicamentos Veterinários em Alimentos, o PAMVet. O objetivo principal do PAMVet é avaliar a exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários por meio do consumo de alimentos, subsidiando, assim, as ações de gerenciamento e comunicação do risco associado a esta exposição. No seu cronograma inicial, o programa contemplava a avaliação dos resíduos de medicamentos veterinários no mel a partir do quinto ano de atividade após a implantação (BRASIL, 2003). Até o momento, o programa realizou análises de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de leite coletadas em estados da região sul (PR, SC e RS), sudeste (ES, MG, RJ, SP) e centro-oeste (GO) do Brasil (BRASIL, 2006).

O MAPA instituiu em 1986 o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR. Em 1999, o programa foi ampliado por meio da Instrução Normativa n.42 de 20 de dezembro de 1999, com a inclusão de programas setoriais para outras matrizes além da carne, como o Programa de Controle de Resíduos em Mel (PCRM) (BRASIL, 1999). O programa previa a determinação de resíduos de sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina e sulfadimetoxina) e tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina) em amostras de mel coletadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). A partir de 2006, o PCRM foi editado anualmente a fim de adequá-lo ao desenvolvimento de novas metodologias analíticas e a inclusão ou exclusão de laboratórios da rede oficial e credenciados pelo MAPA. O PCRM para o ano de 2008 pesquisou resíduos de 17 antimicrobianos, além de outros contaminantes orgânicos e inorgânicos. Os resultados do programa para o ano de 2007 não apresentaram amostras com resíduos de antimicrobianos. As amostras de mel foram analisadas em laboratório da Alemanha (BRASIL, 2008b).

Limites máximos de resíduos (LMR)

O PAMVet definiu os LMR para leite com base nos valores estabelecidos na Resolução GMC n.54 de 2000 (Tabela 1), que dispõe sobre as metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal no âmbito do MERCOSUL (GRUPO MERCADO COMUM, 2000).

Tabela 1. Valores de LMR de antimicrobianos em diferentes matrizes de origem animal estabelecidos para o MERCOSUL.*

Antimicrobiano	Espécie	LMR** (µg kg ⁻¹)					
		Fígado	Rim	Músculo	Gordura	Leite	Ovo
Tetracilinas	Bovino				-	100	-
(Oxitetraciclina,	Ovino	300	600	100	-	100	-
Tetraciclina e	Aves				-	-	200
Clortetraciclina)	Suíno				-	-	-
Cloranfenicol	Não é permitido o uso em animais para produção de alimentos.						
Sulfonamidas	Bovino				-	100	-
(Sulfatiazol,	Ovino	100	100	100	-	100	-
Sulfametazina e	Aves				-	-	-
Sulfadimetoxina)	Suíno				-	-	-
Aminoglicosídeos	Bovino					200	-
(Estreptomicina e	Ovino	500	1000	500	500	-	-
Diidroestreptomicina)	Aves					-	-
	Suíno					-	-

*FONTE: GRUPO MERCADO COMUM, 2000.

**O LMR se refere à soma dos resíduos determinados para cada antimicrobiano pertencente à classe.

Os valores da Tabela 1 são inferiores aos estabelecidos pelo JECFA para resíduos de tetraciclina em músculo ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e ovo ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$). Também é inferior o valor estabelecido pelo MERCOSUL para o LMR de estreptomicina e diidroestreptomicina em músculo ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) em comparação ao estabelecido pelo JECFA ($600 \mu\text{g kg}^{-1}$) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Como não existem LMR para o mel definidos na legislação brasileira e no MERCOSUL, o PNCR estabeleceu os seguintes limites para o programa de mel do ano de 2008: $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para tetraciclina; $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para doxiciclina; $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para sulfonamidas; $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para nitrofurazona, furazolidona, furaltadona e nitrofurantoína; $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cloranfenicol; $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para tilosina; $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para eritromicina; e $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ para estreptomicina.

Métodos de análise de antimicrobianos no mel

Métodos Microbiológicos

Apesar de serem baratos e permitirem a análise de um grande número de amostras, os métodos microbiológicos são demorados, pois é necessário um período de incubação mínimo para crescimento do microrganismo, que varia entre 12 a 24 horas (OKERMAN; HOOF, 1998). Além disso, os métodos inibitórios não são capazes de quantificar os resíduos e apresentam baixa seletividade, pois os microrganismos podem ser susceptíveis a mais de uma substância antimicrobiana presentes na amostra (NAKAZAWA et al., 1999). Outro problema do uso de testes baseados na inibição do crescimento microbiano para análise de resíduos de medicamentos veterinários em mel é que este possui substâncias

como os compostos fenólicos e ácidos aromáticos que podem agir como antimicrobianos e gerar resultados falso-positivos (MUNDO et al., 2004). Os testes de inibição bacteriana são utilizados para triagem (*screening*) das amostras e os resultados positivos devem ser confirmados por métodos de maior seletividade.

Diversos métodos microbiológicos são descritos na literatura para determinação de resíduos de antimicrobianos em tecidos de origem animal, como músculo e rim. Entretanto, são raros os relatos de métodos microbiológicos para determinação de medicamentos veterinários no mel.

Imunoensaios

Métodos imunoquímicos como EIA (“Enzyme immunoassay”) e ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) são utilizados para análise de resíduos de antimicrobianos em alimentos, inclusive o mel. O princípio destes métodos é a interação entre um antígeno, no caso o antimicrobiano de interesse, e seu anticorpo. Os imunoensaios apresentam alta seletividade devido à especificidade da reação antígeno-anticorpo. Entretanto, a preparação do conjugado antígeno-anticorpo requer tempo e laboratório com pessoal especializado (HEERING et al., 1998; THOMSON; SPORNS, 1995). Assim como os métodos microbiológicos, os imunoensaios são mais utilizados para a etapa de triagem das amostras com o objetivo de determinar aquelas que não estão contaminadas em níveis superiores aos permitidos. As amostras consideradas como positivas, devem ser analisadas para confirmação da presença do resíduo do antimicrobiano por meio de um método adequado para este fim (BOGDANOV, 2003).

SHETH e SPORNS (1990) descreveram um método de EIA para detectar sulfatiazol em mel cujo preparo de amostra se resumia a uma etapa de diluição, porém o limite de detecção determinado foi $300 \mu\text{g kg}^{-1}$. Em outro trabalho, THOMSOM e SPORNS (1995) utilizaram cartuchos de SPE para concentrar o sulfatiazol da amostra. O extrato do cartucho é submetido à análise por ELISA e o limite de detecção estabelecido foi de $34 \mu\text{g kg}^{-1}$. Resíduos de sulfatiazol, tetraciclinas e estreptomicina em mel também foram avaliadas por HEERING et al., (1998) utilizando a técnica EIA. Os pesquisadores utilizaram para o preparo de amostra a extração líquido-líquido (LLE) para as tetraciclinas e a combinação de SPE com colunas de imunoafinidade para o sulfatiazol e a estreptomicina. Os limites de detecção foram $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para as tetraciclinas, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a estreptomicina e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o sulfatiazol. As amostras que apresentaram resultado positivo para sulfatiazol foram analisadas por HPLC e não foi possível detectar a presença das sulfonamidas. Segundo os pesquisadores, a causa dos resultados positivos para EIA e negativos para HPLC pode ser a interação do sulfatiazol com os açúcares da amostra. SHEN e JIANG (2005) utilizaram ELISA para triagem de cloranfenicol em diferentes matrizes, inclusive o mel. O preparo de amostra foi realizado com extrações líquido-líquido consecutivas e a confirmação foi feita por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS). Em uma das amostras de mel com resultado negativo no ensaio por ELISA, foi determinado $0,22 \mu\text{g}$ de cloranfenicol por kg de mel na confirmação por GC-MS. SCORTICHINI et al. (2005) validaram um método utilizando ELISA também para determinação da presença de resíduos de cloranfenicol em mel. O preparo de amostra foi feito por LLE e SPE. O limite de quantificação determinado foi $0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$. PASTOR-NAVARRO et al. (2007)

desenvolveram um método de ELISA capaz de determinar resíduos de seis sulfonamidas diferentes presentes no mel, com limite de detecção equivalente a 4 µg de sulfatiazol por kg de mel.

Ensaio de diagnóstico rápido (Kits)

A análise de um grande número de amostras para avaliar a presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos e suas matérias primas é, hoje, uma necessidade nos programas de vigilância e nas indústrias, a fim de garantir a segurança dos alimentos e evitar perdas comerciais. Para atender essa demanda, foram desenvolvidos ensaios para triagem de amostras que podem ser utilizados com maior rapidez e robustez em relação aos ensaios imunológicos e microbiológicos. Esses ensaios, também denominados de *kits*, podem utilizar os princípios de inibição do crescimento bacteriano, da imunoafinidade e de receptores específicos das substâncias antimicrobianas. Para análise de medicamentos veterinários em mel, existem diversos produtos como, por exemplo, CHARM II Test[®] e ROSA Test[®] (Charm Sciences INC.), Delvotest P[®] e Delvotest SP[®] (DSM Food Specialties) e o Transia Plate[®] (Diffchamb AB) (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2004).

SALTER (2003) descreveu a utilização do CHARM II Test[®] para análise de clortetraciclina, streptomina, sulfametazina e cloranfenicol em mel. O autor relatou que os tempos para as análises estavam entre 12 e 60 minutos. Porém, não estão claros no trabalho os valores estabelecidos como limites de detecção do método. O ROSA (Rapid One Step Assay) Test[®] foi avaliado para detecção de tetraciclina e sulfametazina em mel (LEGG et

al., 2003). Os limites de detecção apresentados para tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina foram 33, 200 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para a sulfametazina, o limite de detecção obtido foi 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os autores descreveram que a análise foi concluída em 8 minutos. McMULLEN et al. (2004) avaliaram a utilização do CHARM II Test[®] para determinação de cloranfenicol em mel. Algumas das amostras apresentaram resultado positivo quando analisadas pelo *kit*. Porém, estas haviam sido previamente analisadas por LC-MS e consideradas livres de cloranfenicol. Dois fatores foram identificados como causadores do problema: a presença de partículas sólidas e a viscosidade do mel, esta última relacionada à concentração dos principais açúcares que constituem o produto. Após modificações e adaptações realizadas no procedimento de preparo da amostra, foi possível utilizar o kit para detecção de cloranfenicol em mel na concentração de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 25 minutos de análise.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise de resíduos de antimicrobianos envolve a determinação de concentrações na ordem de microgramas (μg) ou nanogramas (ng) do contaminante por quilograma (kg) de matriz. Esta baixa concentração dificulta os procedimentos analíticos, principalmente em amostras complexas como os alimentos, onde a separação do analito de interesse dos outros componentes é uma tarefa difícil. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação de compostos através das diferenças de afinidade que estes apresentam em relação à fase estacionária e a fase móvel. A associação de HPLC com diferentes técnicas de detecção possibilita a análise qualitativa e quantitativa de um grande número

substâncias, incluindo a maioria dos antimicrobianos. As técnicas de detecção mais utilizadas são espectrofotometria UV-visível (UV), a fluorescência e a espectrometria de massas (MS). Na tabela 2 estão resumidas as condições de análise de alguns métodos que utilizam HPLC associada a diversos detectores para determinação de resíduos de antimicrobianos em mel.

Tabela 2. Métodos de HPLC para determinação de resíduos de antimicrobianos em mel.

Resíduo	Método de detecção/análise	Fase móvel	Coluna analítica	Limite de detecção	Referência
Tetraciclinas	MS	Ácido fórmico/ Ácido oxálico / Metanol	Gênesis C ₁₈	25 µg kg ⁻¹	ALFREDSSON et al. (2005)
Tetraciclinas	Fluorescência	Acetonitrila/ Tampão oxalato	Nucleosil C ₁₈	20 µg kg ⁻¹	PENA et al. (2005)
Tetraciclinas	Químio-luminescência	Acetonitrila/Ácido fosfórico	Zorbax XDB C ₁₈	5 µg kg ⁻¹	WAN et al. (2005)
Oxitetraciclina	UV	Acetonitrila/ Ácido oxálico	Lichrosphere C ₁₈	50 µg kg ⁻¹	DIEGUEZ et al. (2004)
Tetraciclinas	UV	Acetonitrila/ Metanol /Ácido oxálico.	Discovery RP-Amide C ₁₆	4-10 µg kg ⁻¹	VIÑAS et al.. (2004)
Oxitetraciclina	UV	Acetonitrila/ Ácido oxálico	Luna fenil hexil	25 µg kg ⁻¹	PAGLIUCA et al. (2002)
Tetraciclinas	MS	Acetonitrila/ Metanol /Ácido oxálico.	Bakerbond C ₈	1 a 4 µg kg ⁻¹	NAKAZAWA et al. (1999)
Tetraciclinas	MS	Acetonitrila/ Metanol/ Ácido trifluoroacético/ tioglicerol	Inertsil fenil	100 µg kg ⁻¹	OKA et al. (1994)
Tetraciclinas Sulfatiazol	UV	Acetonitrila/ Água / SDS ^a	Pecosphere CR C ₁₈	900 a 3000 µg kg ⁻¹	DIAZ et al. (1990)
Sulfonamidas	MS	Acetonitrila/ Ácido acético.	Atlantis C ₁₈	0,5 – 6 µg kg ⁻¹	PANG et al. (2005)
Sulfonamidas	MS	Acetonitrila/ Ácido fórmico.	-	0,5 – 2 µg kg ⁻¹	THOMPSON e NOOT (2005)
Sulfonamidas	Fluorescência	Acetonitrila/ Tampão acetato	Puroepher Star C ₁₈	1 – 2 µg kg ⁻¹	MAUDENS et al. (2004)
Sulfonamidas Tetraciclinas	MS	Acetonitrila/ Ácido fórmico.	Nucleosil C18	0,5 a 10 µg kg ⁻¹	KAUFMANN et al. (2002)
Sulfonamidas	Fluorescência	Acetonitrila/ Fosfato de potássio/ Ácido acético.	SymmetryShield C ₁₈	2 – 5 µg kg ⁻¹	PANG et al. (2003)

Tabela 2. Continuação.

Resíduo	Método de detecção/análise	Fase móvel	Coluna analítica	Limite de detecção	Referência
Sulfonamidas	Fluorescência	Acetonitrila/ Ácido acético.	Luna RP C ₁₈	0,1-0,2 µg kg ⁻¹	POSYNIAK et al. (2003)
Sulfatiazol	Fluorescência	Acetonitrila/ Ácido acético	Hypersil C ₁₈	10 µg kg ⁻¹	MARTEL e ZEGANNE (2003)
Sulfonamidas	MS	Acetonitrila/ Ácido fórmico	C ₁₈	Não divulgado	VERZEGNASSI et al. (2002)
Sulfonamidas	UV	Acetonitrila/ Ácido cítrico/ SDS ^a	Hypersil C ₁₈	400-2000 µg kg ⁻¹	CABALLERO et al. (2001)
Sulfonamidas	UV	Acetonitrila/ Fosfato de sódio	LiChrosphere RP C ₁₈	50 µg kg ⁻¹	HORIE et al. (1992)
Estreptomicina	MS	Acetonitrila /Ácido pentafluoropropionico	Alltima C ₁₈	1- 2 µg kg ⁻¹	BRUIJNSVOORT et al. (2004)
Estreptomicina Diidroestreptomicina	MS	Acetonitrila / Ácido heptafluoro-n-butirico	TSK-gel super C ₁₈	10 µg kg ⁻¹	HORIE et al. (2004)
Estreptomicina	Fluorescencia	Acetonitrila/ AHS ^b / NQS ^c	Hypersil C ₁₈	5 µg kg ⁻¹	EDDER et al. (1999)
Cloranfenicol	MS	Acetonitrila/ Acetato de amônio	Ascentis C ₁₈	0,02 µg kg ⁻¹	BOYD et al. (2007)
Cloranfenicol	MS	Acetonitrila/ Água	SymmetryShield C ₁₈	<0,1 µg kg ⁻¹	VERZEGNASSI et al. (2003)
Cloranfenicol	MS	Acetonitrila/ Ácido fórmico	Xterra fenil	1 µg kg ⁻¹	TURNIPSEED et al. (2002)
Cloranfenicol	MS	Metanol/ Ácido fórmico.	Purospher C ₁₈ RP	1µg kg ⁻¹	HORMAZABAL e YNDESTAD (2001)

^aDodecil sulfato de sódio; ^bheptano sulfonato de sódio; ^csal de sódio do ácido 1, 2 naftoquinona-4-sulfônico.

ISOHERRANEN e SOBACK (1999) revisaram diversos métodos de análise cromatográfica para determinação de aminoglicosídeos, incluindo a estreptomicina e a diidroestreptomicina. Os autores afirmam que, devido às características dos aminoglicosídeos, HPLC é a técnica mais apropriada para análise destes compostos.

Entretanto, a alta polaridade das moléculas e a ausência de um cromóforo dificultam tanto a separação quanto a detecção. Para melhorar a separação entre a estreptomicina e a dihidrostreptomicina em coluna de fase reversa, EDDER et al. (1999) utilizaram a cromatografia de par iônico, adicionando à fase móvel os alquilsulfonatos como contra-íons. A mesma técnica foi utilizada por PANG et al. (2004). Ambos os autores fizeram a derivatização dos analitos com hidróxido de sódio, pós-coluna analítica, para permitir a detecção por fluorescência.

Na determinação de estreptomicina em méis por LC- MS, os alquilsulfonatos podem ser substituídos pelo ácido pentafluoropropiônico, pois os alquilsulfonatos são incompatíveis com os sistemas de LC-MS (BRUIJNSVOORT et al., 2004).

As tetraciclinas possuem a característica de interagir fortemente com os grupos silanóis e traços de metais presentes nas colunas cromatográficas no suporte de sílica. Este fato favorece a formação de caudas nos picos detectados. Para superar este problema, são apresentadas diversas soluções como a utilização de colunas com recheio a base polímeros e colunas com substituintes que formam uma proteção dos grupos silanóis residuais presentes no esqueleto de sílica (*end-capping*). Outra forma de diminuir as interações das tetraciclinas com os silanóis é a utilização de ácidos na fase móvel como o fosfórico, o cítrico, o tartárico e o oxálico, sendo que com este último os picos apresentam melhor simetria. Outro composto utilizado para melhorar a simetria dos picos é o sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (NA₂EDTA). As tetraciclinas apresentam fluorescência quando complexadas com íons metálicos como, por exemplo, Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ ou quando em meio básico. Elas apresentam, também, absorção no UV entre 270 e 360 nm. Portanto,

ambos os detectores, UV e fluorescência, são utilizados na determinação de tetraciclinas em mel (ANDERSON et al., 2005; OKA et al., 2000).

A espectrofotometria UV com comprimentos de onda entre 260 e 285 nm é utilizada por diversos autores na determinação de resíduos de sulfonamidas em mel (DIAZ et al., 1990; HORIE et al. 1992; VIÑAS et al. 1995; CABALLERO et al., 2001). Outros pesquisadores realizaram a determinação de sulfonamidas em mel com detectores de fluorescência após derivatização dos antimicrobianos com fluoroescamina (MARTEL; ZEGGANE, 2003; MAUDENS et al., 2004; PANG et col., 2003; POSYNIAK et al., 2003). Os métodos existentes na literatura para determinação de sulfonamidas em mel descrevem a utilização de colunas de fase reversa tipo octadecil (C_{18}). HORIE et al. (1992) relataram a determinação de 10 sulfonamidas em mel com um tempo de análise cromatográfica de 20 minutos. CABALLERO et al. (2001) realizaram a separação cromatográfica de 15 sulfonamidas, sendo que 11 delas puderam ser determinadas como resíduos no mel com limites de detecção entre 100 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os autores destacaram a dependência dos fatores de retenção (k) com relação ao pH da fase móvel e a utilização deste parâmetro, juntamente com a adição de compostos surfactantes, como ferramentas para incrementar a separação e resolução dos picos. De maneira semelhante, VIÑAS et al. (1995) estudaram o comportamento dos k de cinco sulfonamidas em relação à composição da fase móvel contendo acetonitrila e água. Os valores de k declinaram rapidamente com o acréscimo de acetonitrila na fase móvel de 0 a 20% (v/v).

Os métodos de cromatografia líquida para determinação de cloranfenicol em méis desenvolvidos nos últimos anos utilizam as colunas de fase reversa C_{18} e o espectrômetro

de massas como detector. As diferenças entre as etapas cromatográficas destes métodos estão na composição da fase móvel utilizada. Foram utilizadas misturas de metanol e ácido fórmico (HORMAZÁBAL; YNDESTAD, 2001), metanol e acetato de amônio (FORTI et al., 2005), água e acetonitrila (ORTELLI et al., 2004; VERZEGNASSI et al., 2003), ácido fórmico e acetonitrila (TURNIPSEED et al., 2002), formiato de amônio e acetonitrila (BOGUSZ et al., 2004).

Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica analítica que teve grande desenvolvimento na década de 90. Suas vantagens em relação à HPLC são: uso de nenhum ou pouco solvente orgânico no tampão de corrida e um curto tempo para separação com elevada eficiência, permitindo uma redução no custo de análise. A CE utiliza capilares de sílica fundida, os quais são mais baratos que as colunas analíticas empregadas em HPLC (HERNÁNDEZ et al., 2003). Porém, a CE utiliza um pequeno volume da amostra (na ordem de nanolitros), o que dificulta a análise de resíduos em alimentos devido à pequena massa do analito no sistema de detecção (OKA et al., 2000). A técnica proporciona alta eficiência na separação, o que pode reduzir o trabalho de limpeza da amostra e o tempo para desenvolvimento das condições de separação (DONG, 1999).

A análise de resíduos de antimicrobianos em alimentos e matrizes biológicas por CE tem ganhado maior dimensão nos últimos anos. HERNÁNDEZ et al. (2003) relataram diversas aplicações da CE na análise de fluoroquinolonas, β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclins em matrizes como plasma, músculo, leite, urina e ovos. No entanto, não foram encontrados na literatura relatos da análise de resíduos de antimicrobianos em mel por CE.

Espectrometria de massas (MS)

O espectrômetro de massas possibilita a confirmação da identidade do composto de interesse através dos dados sobre a sua massa e estrutura molecular. As informações são obtidas da relação massa (m)/carga (z) do íon precursor gerado no processo de ionização (MS) e seus produtos de fragmentação (MS/MS). Além da possibilidade de confirmação da identidade da substância analisada, a alta seletividade da espectrometria de massas pode ajudar na identificação de componentes da amostra que não apresentem boa resolução na separação cromatográfica devido a semelhanças estruturais, evitando possíveis interferências na determinação quantitativa de contaminantes (GENTILI et al., 2005). Para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em mel, a espectrometria de massas tornou-se uma importante ferramenta analítica e seu uso está amplamente difundido entre os pesquisadores. Entretanto, os equipamentos disponíveis atualmente apresentam um custo elevado em comparação aos detectores mais comuns, como o de fluorescência e de UV.

KAUFMANN et al. (2002) desenvolveram um método para determinação de sulfonamidas e tetraciclinas em mel utilizando LC-MS/MS. Os autores utilizaram um equipamento do tipo triplo quadrupolo com sistema de ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI^+). Os autores afirmaram que a baixa recuperação calculada para as sulfonamidas que eluíram primeiro da coluna cromatográfica pode ter ocorrido em razão de perdas no processo de limpeza da amostra e a ocorrência de supressão do sinal do detector pela matriz para estes compostos, o que não ocorreu com as sulfonamidas que ficaram maior tempo retidas na coluna. Situação oposta ocorreu com a oxitetraciclina e a

tetraciclina, que apresentaram um incremento do sinal quando no extrato final de uma matriz fortificada em comparação aos padrões puros. VERZEGNASSI et al. (2002) também detectaram a ocorrência de supressão no sinal obtido na análise de sulfonamidas em mel por LC-MS/MS com ionização por ESI⁺. Os autores relataram que não foi possível estabelecer uma correlação entre a supressão do sinal e as quantidades de açúcares e hidroximetilfurfural contidos no mel analisado. Ressaltaram, ainda, que a supressão do sinal impediu a análise quantitativa das sulfonamidas, pois inferiu grande variação no coeficiente angular das curvas de calibração. Recentemente, outro método de determinação por LC-MS/MS foi descrito por THOMPSON e NOOT (2005) para determinação de sulfonamidas em mel. Os autores utilizaram uma coluna de SPE diretamente acoplada ao sistema LC-MS/MS. As sulfonamidas foram extraídas *on-line* e analisadas no modo ESI⁺. Por meio da variação na composição da fase móvel, foi possível fazer de forma sequencial a limpeza da amostra e a eluição das sulfonamidas. Durante a limpeza, o fluxo de fase móvel foi desviado da fonte de ionização por uma válvula acoplada ao sistema. O fluxo foi redirecionado para o sistema MS/MS somente durante o período de eluição das sulfonamidas, analisadas por monitoramento das reações múltiplas (MRM).

Conforme já mencionado, a estreptomicina e a diidroestreptomicina são compostos que não fluorescem e não apresentam forte absorção no UV, dificultando a detecção em sistemas de HPLC com detectores de fluorescência e UV. A espectrometria de massas surge como alternativa aos processos de derivatização normalmente utilizados para determinação destes antimicrobianos em mel. HORIE et al. (2004) desenvolveram um método para análise de estreptomicina e diidroestreptomicina em mel por LC-MS. A ionização dos analitos foi feita por ESI⁺, enquanto que a determinação das espécies iônicas

relativas a cada antimicrobiano foi realizada pelo sistema de monitoramento do íon selecionado (SIM - *selected ion monitoring*). BRUIJNSVOORT et al. (2004) também utilizaram o modo de ionização por ESI^+ para determinação de estreptomicina e diidroestreptomicina em mel, com limites de quantificação de 1 e 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Diferentemente do anterior, este método utilizou a fragmentação dos íons (MS/MS) para confirmação dos compostos.

A determinação de tetraciclinas em mel por LC-MS foi, primeiramente, relatada por OKA et al. (1994). O método utilizava como fonte de ionização a técnica denominada *Fast Atom Bombardment* (FAB), que necessitava de uma fase móvel volátil para evitar obstrução na interface com o espectrômetro de massas e depósitos de materiais na fonte de ionização. O limite de detecção foi de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o tempo de análise cromatográfica superior a 50 minutos. Outra técnica de ionização utilizada para determinação de resíduos de tetraciclinas em mel é a APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). NAKAZAWA et al. (1999) utilizaram a APCI mantendo a temperatura da interface a 400°C, o que gerou a decomposição do ácido oxálico utilizado na fase móvel para melhorar a resolução cromatográfica dos picos, mas que poderia causar obstrução na entrada do espectrômetro de massas. Os limites de detecção obtidos para OTC, TC e clortetraciclina permaneceram entre 1 e 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e o tempo corrida foi de 18 minutos. O artifício de manter a fonte de ionização a alta temperatura para decomposição do ácido oxálico contido na fase móvel também foi utilizado por ALFREDSSON et al. (2005) para determinação de oxitetraciclina em mel, mas utilizando a ESI^+ como fonte de ionização.

Na determinação de resíduos de cloranfenicol no mel, a técnica de LC-MS tem sido a mais utilizada. Este fato é, provavelmente, consequência da proibição por diversos países de uso deste antimicrobiano na criação de animais para produção de alimentos. A “tolerância zero” estabelecida implica na necessidade de se utilizar métodos que permitam a determinação e confirmação de identidade do antimicrobiano em níveis de concentrações muito baixos como, por exemplo, o nível mínimo requerido pela União Européia de $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2002b). HORMAZÁBAL e YNDESTAD (2001) utilizaram um LC-MS do tipo quadrupolo simples com APCI e obtiveram um limite de detecção de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e um tempo de corrida de 12 minutos. TURNIPSEED et al. (2002) desenvolveram um método para determinação qualitativa de cloranfenicol em mel utilizando um equipamento do tipo *Ion Trap* com ionização por ESI no modo negativo e espectrometria de massas sequencial (MS/MS). O limite de detecção obtido foi $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. VERZEGNASSI et al. (2003) desenvolveram um método quantitativo com limite de detecção inferior a $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando ESI no modo negativo e o monitoramento das transições entre os íons pelo sistema SRM (*Selected Reaction Monitoring*) em equipamento do tipo triplo quadrupolo. Com equipamentos de LC-MS/MS equivalentes e utilizando o mesmo modo de operação (ESI-, SRM), outros três métodos relatados na literatura apresentaram para a determinação de cloranfenicol em mel limites de detecção iguais a $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BOGUSZ et al., 2004), $0,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ORTELLI et al., 2004) e $0,07 \mu\text{g kg}^{-1}$ (FORTI et al., 2005).

Preparo de amostras para HPLC

As etapas mais importantes e laboriosas de um método para análise de antimicrobianos em mel são a extração da(s) substância(s) de interesse e a limpeza do extrato. A dificuldade aumenta quando o método visa determinar os resíduos de diversos compostos simultaneamente. Mesmo pertencendo a uma mesma classe, os antimicrobianos podem apresentar propriedades físicas e químicas diferentes.

Duas técnicas são mais utilizadas para a extração de antimicrobianos de alimentos: a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Esta última tem substituído a LLE por apresentar vantagens, tais como: maior rapidez, melhor precisão, extratos mais limpos, menor quantidade de amostra, menor quantidade de solventes orgânicos, possibilidade de automação e menor quantidade de resíduos.

A extração de resíduos de tetraciclinas em alimentos, inclusive o mel, é dificultada pelo fato destas substâncias formarem quelatos com íons metálicos e interações com proteínas presentes na matriz. Além disso, as tetraciclinas podem interagir fortemente com grupos silanóis presentes em cartuchos de SPE a base de sílica, assim como ocorre em colunas analíticas de separação cromatográfica (OKA et al., 2000). Porém, essas dificuldades têm sido superadas através do controle de pH da solução de extração e pelo uso de substâncias que minimizam as interações com os grupos silanóis, como o EDTA e o ácido oxálico, além do desenvolvimento de polímeros para substituírem a sílica nos cartuchos de extração e nas colunas analíticas. De acordo com as constantes de dissociação (pKa) e devido à presença de grupos substituintes com nitrogênio, as tetraciclinas apresentam cargas em todas as faixa de pH. Mesmo havendo um valor de pH no qual as

moléculas apresentam-se na forma de *zwitterions*, com uma carga total neutra, a presença de cargas pontuais diminui a solubilidade das tetraciclinas em solventes imiscíveis em água, dificultando a extração por LLE. Para a determinação de resíduos de oxitetraciclina em mel, DIAZ et al. (1990) apresentam um preparo de amostra simples, contando com apenas uma etapa de diluição. Porém, o método apresenta baixa detectabilidade e a introdução de todos os compostos da amostra na coluna analítica aumenta a interferência no resultado e diminui a vida da coluna. A dissolução da amostra em tampão McIlvaine (pH=4) contendo Na₂EDTA e, em seguida, aplicação desta em cartucho de SPE é o procedimento mais citado na literatura para análise de oxitetraciclina em mel (ANDERSON et al., 2005). As diferenças entre os métodos são, principalmente, os volumes de diluição do mel e o tipo de cartucho utilizado. Em uma revisão de métodos para determinação de tetraciclinas feita por OKA et al. (2000), foi observado que a maioria dos cartuchos utilizados para extração das tetraciclinas é de sílica modificada com grupos octadecil (C18). Porém, mais recentemente, outros autores têm relatado que o uso de cartuchos à base de polímeros melhora o nível de recuperação dos analitos (CINQUINA et al., 2003; KAUFMANN et al., 2002; PAGLIUCA et al., 2002; VIÑAS et al., 2004).

A extração do cloranfenicol de alimentos pode ser feita através de LLE com solventes como metanol, acetonitrila, acetato de etila ou diclorometano. Para a limpeza do extrato com SPE, tanto cartuchos de fase normal quanto reversa têm sido utilizados, sendo que, para C₁₈, foram obtidos melhores níveis de recuperação do analito em comparação com fase normal (FEDENIUK; SHAND, 1998). Para o mel, uma combinação de LLE com SPE é relatada por diferentes autores. HORMAZÁBAL e YNDESTAD (2001) iniciam a extração LLE utilizando uma mistura de solventes. Posteriormente, a fração orgânica é

evaporada e reconstituída em solução aquosa, para ser aplicada ao cartucho de SPE. Procedimento semelhante em relação à sequência de extrações foi relatado em boletim do FDA-Food and Drug Administration (TURNIPSEED et al., 2002). Porém, a primeira etapa da LLE é feita com acetato de etila e, após evaporação do solvente orgânico e dissolução em meio aquoso, uma segunda extração é feita com hexano para retirar interferentes apolares. Para limpeza do extrato foi utilizada uma sequência de dois cartuchos de SPE, C₁₈ e trocador catiônico. Já VERZEGNASSI et al. (2003) iniciou o procedimento de extração do analito por meio da SPE com cartuchos a base de polímeros. O extrato obtido após a SPE foi, então, limpo por meio de LLE com mistura de acetonitrila e diclorometano. A fração orgânica foi evaporada até a secura e o extrato final redissolvido em água.

Para a determinação de estreptomicina em mel, EDDER et al. (1999) utilizaram SPE combinando cartuchos de troca iônica e C₁₈ para extração e limpeza da amostra, respectivamente. Os autores relataram que este procedimento de preparação amostra proporcionou uma boa seletividade do método, assim como recuperação dos analitos superior a 80 %. BRUIJNSVOORT et al. (2004) descreveram a análise da estreptomicina em mel através de LC-MS utilizando uma única etapa de extração e limpeza por SPE com cartuchos C₁₈. Para aumentar a retenção do antimicrobiano no cartucho de fase reversa, os autores adicionaram ao tampão de extração um contra-íon, o ácido heptanosulfônico. O mesmo contra-íon foi utilizado por HORIE et al. (2004), porém estes últimos autores fizeram uma primeira passagem do extrato diluído em água pelo cartucho de polímero, sem retenção da estreptomicina e diidroestreptomicina. O cartucho foi condicionado novamente e o extrato, agora com o contra-íon, foi aplicada uma segunda vez, possibilitando a retenção dos analitos. Em outro método desenvolvido por PANG et al. (2004), a utilização do

contra-íon para retenção no cartucho C₁₈ foi precedida de uma etapa de extração dos analitos com SPE de troca catiônica.

HORIE et al. (1992) utilizaram para a extração de sulfonamidas do mel, LLE com clorofórmio após dissolver a amostra em uma solução de cloreto de sódio 30%. Apesar da recuperação dos analitos ter apresentado valores de até 90 %, os limites de detecção obtidos foram de 50 µg kg⁻¹. A limpeza do extrato foi feita por SPE com Florisil. VIÑAS et al. (1995) fizeram somente a diluição da amostra com água e injeção direta desta solução no cromatógrafo. De maneira semelhante, CABALLERO et al. (2001) não utilizaram etapa de extração para análise de sulfonamidas em mel. Os autores fizeram a diluição da amostra em solução de dodecilsulfato de sódio, sonificação e filtragem antes da injeção. KAUFMANN et al. (2002) relataram a necessidade de uma etapa de hidrólise com ácido clorídrico, anterior a SPE, para liberar as sulfonamidas ligadas aos açúcares da matriz. Após a hidrólise, a extração foi feita utilizando cartuchos com fase reversa à base de polímeros. Segundo os autores, sem a etapa de hidrólise, a determinação de sulfonamidas em mel ficaria subestimada. Este fato foi relatado, também, por VERZEGNASSI et al. (2002), porém estes utilizaram o ácido tricloroacético para a hidrólise e o pH da solução foi corrigido para 6,5 para, então, realizar a extração das sulfonamidas com uma mistura de acetonitrila e diclorometano. MARTEL e ZEGGANE (2003) fizeram a etapa de hidrólise com HCl e utilizaram uma alíquota desta solução para a derivatização do sulfatiazol com fluoroescamina e análise direta por HPLC. A combinação sequencial de cartuchos de troca iônica e fase reversa foi utilizada por PANG et al. (2003) para extração e limpeza, respectivamente, na análise de sulfonamidas em mel. A etapa de hidrólise anterior à extração foi realizada com ácido fosfórico o que permitiu a aplicação direta da amostra ao

cartucho de troca iônica e reduziu a possibilidade de nova interação das sulfonamidas com os açúcares. A eficiência de extração superou 73% para oito sulfonamidas estudadas. POSYNIAK et al. (2003), utilizaram tampão acetato (pH entre 3 e 7) para dissolver a amostra e aplicaram esta solução diretamente ao cartucho de SPE do tipo C₁₈ após imersão em banho de ultrassom. Os valores apresentados para recuperação dos analitos foram superiores a 80% com coeficientes de variação entre 5 e 8%. MAUDENS et al. (2004) fizeram hidrólise com HCl seguida de extração com acetonitrila e limpeza do extrato com SPE de troca catiônica. O método apresentou boa precisão e os valores para recuperação das sulfonamidas ficaram entre 37 e 67 %. THOMPSON e NOOT (2005) utilizaram um cartucho de SPE *on line* ao sistema LC-MS/MS. Os processos de extração das sulfonamidas e limpeza do extrato foram feitos com alterações na fase móvel do sistema e desvio do fluxo desta para o descarte até momento anterior à eluição dos analitos. Os autores reportam coeficientes de variação para a repetibilidade abaixo de 20% e valores para recuperação dos analitos entre 60 e 110 %.

Recentemente, novas técnicas de preparo da amostra têm sido utilizadas na análise de resíduos de medicamentos veterinários no mel. BOYD et al. (2007) sintetizaram polímeros de impressão molecular (MIP) para utilização como recheio de cartuchos de SPE para determinação de cloranfenicol e reportaram a capacidade de detecção do método como 0,02 µg kg⁻¹. CHEN et al. utilizaram a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) também para a análise de resíduos de cloranfenicol e obtiveram para o limite de detecção o valor de 0,6 µg kg⁻¹.

Considerações Finais

A utilização de medicamentos veterinários na apicultura é uma realidade em diversos países do mundo e tende a tornar-se prática também no Brasil devido ao crescimento dessa atividade e ao intercambio comercial entre países, que favorece a disseminação de doenças. Como principais conseqüências desta prática destacam-se dois aspectos: a problemática mundial relacionada ao desenvolvimento de resistência das bactérias à ação dos antimicrobianos e a presença de resíduos desses compostos no mel. O primeiro aspecto é de fundamental importância para a saúde pública, pois as bactérias patogênicas aos homens, animais, insetos e plantas têm adquirido resistência às substâncias que eram eficazes para seu controle. Com isso, os tratamentos exigem o uso de substâncias mais potentes que, muitas vezes, são mais caras e tóxicas. A inserção dos antimicrobianos no ambiente por meio do mel aumenta a probabilidade de interação daqueles com os microrganismos patogênicos caracterizando o produto como uma fonte potencial para o desenvolvimento de resistência bacteriana. O segundo aspecto envolve os riscos à saúde do consumidor devidos a exposição a essas substâncias através dos alimentos. O Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabelece valores seguros para os níveis de ingestão diária dessas substâncias após avaliação dos estudos toxicológicos das mesmas. As recomendações do JECFA são adotadas pelo Comitê do Codex Alimentarius com o intuito de proteger a saúde dos consumidores e desenvolver o comércio global de alimentos. Paralelamente, informações sobre os níveis de resíduo dos medicamentos de uso veterinário e de consumo de mel pela população são necessários para estabelecer o risco à saúde que essas substâncias oferecem e, assim, poder definir medidas de vigilância sanitária a serem adotadas pelas agências governamentais que lidam com saúde pública. Atualmente,

poucas nações estabelecem limites máximos para resíduos de medicamentos veterinários no mel. Portanto, o monitoramento dos níveis de resíduos no mel comercializado no país e exportado é de fundamental importância para proteger a saúde dos consumidores e evitar barreiras à comercialização do produto em nível global, proporcionando o desenvolvimento da atividade apícola no Brasil, a qual apresenta grande potencial de desenvolvimento. Para tanto, é importante salientar a necessidade do desenvolvimento de técnicas analíticas que possibilitem a determinação precisa e exata dos resíduos de substâncias antimicrobianas que possam ser adicionadas durante a produção de mel, aumentando, assim, a confiabilidade dos resultados. Como discutido anteriormente, é crescente o número de trabalhos publicados nas revistas científicas que reportam métodos analíticos para este fim, fato que demonstra a preocupação sobre o assunto.

Referências Bibliográficas

AGRONOTÍCIAS. Disponível em:

<http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2004/06/17a.htm>. Acesso em: 20 jun. 2009.

ALFREDSSON et al. A. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 47-51, 2005.

ALIPPI, M. A.; AGUILAR, M. O. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.72, 21-27, 1998.

ANDERSON et al. Complexities in tetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 23-32, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. Antibiotic Test Kits. Disponível em:< <http://www.aoac.org/testkits/TKDATA4.HTM>>. Acesso em: 19 jul 2004.

- BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v.37, p.1-18, 2006.
- BOGDANOV, S. Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products. **Apiacta**, v.38, p.190-197, 2003.
- BOGUSZ et al. Rapid determination of chloramphenicol and its glucoronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 343–356, 2004.
- BOYD et al. Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, v. 1174, p. 63–71, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº42 de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da União*, 22 dez. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº11 de 20 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, 23 out. 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n.253 de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal - PAMVet. **Diário Oficial da União**, 18 set. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal- PAMVet. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. 2006. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>>. Acesso em 20 jun. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 18 de 08 de abril de 2008. Incorpora ao ordenamento jurídico nacional os "Requisitos Zoossanitários para a importação de abelhas rainhas e produtos apícolas destinados aos Estados Partes" aprovados pela Resolução GMC - MERCOSUL nº 23/07. **Diário Oficial da União**, 09 abr. 2008a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.9 de 10 de abril de 2008. Publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Suína, Aves e Equina), Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2007, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa nº 9, de 30/03/2007. **Diário Oficial da União**, 17 abr. 2008b.

- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet - ALICE-Web. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>>. Acesso em 22/04/2009.
- BRUIJNSVOORT et al. Determination of streptomycin and dihidrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1058, p. 137–142, 2004.
- CABALLERO et al. Micellar chromatographic procedure with direct injection for the determination of sulfonamides in milk and honey samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 1, p. 117-131, 2001.
- CHEN et al. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 80–85, 2009.
- CINQUINA et al. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 227-233, 2003.
- CLAY, H. American Foul Brood is Back. **Hivelights**, v. 13, n. 4, 2000. Disponível em:<<http://www.honeycouncil.ca/indexe.html>>. Acesso em: 17 set. 2004.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Decisão da Comissão, de 30 de Janeiro de 2002, relativa a certas medidas de proteção no que diz respeito aos produtos de origem animal importados da China, nº C(2002) 387. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, L. 45, p. 50-51, 2002a.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Decisão da Comissão, de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, L. 221, p. 8-36, 2002b.
- CORBETT, C. E. **Farmacodinâmica**, 4^a ed., Editora Artes Médicas, São Paulo, p. 753-755, 1973.
- COSTA et al. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. **Food Chemistry**, v. 65, n. 3, p. 347-352, 1999.
- DIAZ et al. Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography. **Analytical Letters**, v. 23, n. 4, p.607-616, 1990.
- DIEGUEZ et al. Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 31, n.1, p. 159-166, 2004.

- DONG, Y. Capillary electrophoresis in food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.87-93, 1999.
- EDDER et al. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p.345-351, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de Produção 3: Produção de Mel 2003**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em 22/09/2005.
- EUZÉBY, J.P. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire: *Mellissococcus plutonius***. Disponível em:<<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/mm/mellissococcus>>. Acesso em: 07 out. 2002.
- FEDENIUK, R.W.; SHAND, P.J. Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 3-15, 1998.
- FELDLAUFER et al. Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honeybees. **Apidologie**, v. 32, p. 547-554, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT - Statistical Databases**. Disponível em: <<http://apps.fao.org/default.jsp>>. Acesso em: 12/12/2004.
- FORTI et al. Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 257-263, 2005.
- GENTILI et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 704-733, 2005.
- GRUPO MERCADO COMUM. Regulamento Técnico Mercosul Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos Para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. **Resolução GMC**, nº 54, 2000. Disponível em: < <http://www.mercosul.gov.br/normativas>>. Acesso em: 14/12/2004.
- HEERING et al. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. **Analyst**, v. 123, p. 2759-2762, 1998.
- HERNÁNDEZ et al. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7-8, p. 416-427, 2003.
- HORIE et al. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 75, n. 5, p. 786-789, 1992.

- HORIE et al. Determination of streptomycin and dihidrostreptomycin in honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.27, n. 5, p. 863-874, 2004.
- HORMAZÁBAL, V.; YNDESTAD, M. Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meta and milk and chloramphenicol in egg, honey, and urine using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 16, p. 2477-2486, 2001.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2002**, v. 30, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2003**, v. 31, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2007**, v. 35, 2007. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>>. Acesso em 22/04/2008.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. CHLORAMPHENICOL. **Summaries & Evaluations**, v.50, p. 169, 1990.
- ISOHERRANEN, N., SOBACK, S. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 82, n. 5, p. 1017-1045, 1999.
- JEON, M.; PAENG, I. R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 180–185, 2008.
- JORGENSEN, S.E., HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, p. 691-699, 2000.
- KAUFMANN et al. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 85, n. 4, p. 853-860, 2002.
- KOCHANSKY, J.; PETTIS, J. Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. **Journal of Apicultural Research**, v.44, n.1, p. 24-28, 2005.
- LEGG et al. ROSA (Rapid One Step Assay) for antibiotics in honey. **Apiacta**, v.38, p.207-217, 2003.
- LEITE et al. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. **Food Chemistry**, v. 70, p. 93-98, 2000.

- MARTEL, A.; ZEGGANE, S. HPLC Determination of sulfathiazole in french honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 6, p. 953-961, 2003.
- MARTIN, P. Veterinary drug residues in honey. **Apiacta**, v. 38, p. 31-23, 2003.
- MAUDENS et al. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 85-92, 2004.
- McMULLEN et al. Modifications and adaptations of the Charm II rapid antibody assay for chloramphenicol in honey. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 7, p. 1533-1536, 2004.
- MESSAGE, D.; DE JONG, D. Dispersão internacional da bactéria *Paenibacillus larvae*, causadora da cria pútrida americana através da comercialização de mel. **Mensagem doce**, v.50, 1999. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em 20 Jun. 2009.
- MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B.. Glicídios no Mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- MUNDO et al. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 1-8, 2004.
- MUTINELLI, F. Pratical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. **Apiacta**, v. 38, p. 149-155, 2003.
- MYAGY et al. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 95-96, 2000.
- NAKAZAWA et al. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 732, p. 55-64, 1999.
- NELSON, D.; MELATHOPOULOS, A. Developing new tools to manage American foulbrood in an era of oxytetracycline resistance. **Hivelights**, v.15, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://www.honeycouncil.ca/nelson02>>. Acesso em: 09 out. 2002.
- OKA et al. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 109-133, 2000.

- OKA et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics. identification of residual tetracyclines in honey by frit FAB/LC/MS using a volatile mobile phase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2215-2219, 1994.
- OKERMAN, L.; HOOF, J.V. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.81, n. 1, p.51- 56, 1998.
- ORTELLI et al. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 59, p. 61-64, 2004.
- PAGLIUCA et al. A scientific note on the determination of oxytetracycline residues in honey by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Apidologie**, n. 33, p. 583-584, 2002.
- PANG et al. Evaluation of analyte stability and method ruggedness in the determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography with post-column derivatization. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 87, n. 1, p. 39-44, 2004.
- PANG et al. Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 534-541, 2003.
- PASTOR-NAVARRO et al. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: Application to bee honey analysis. **Talanta**, v.71, p.923-933, 2007.
- PENA et al. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3784-3788, 2005.
- PENG et al. Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Development and prevention of American foulbrood disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 65-71, 1996.
- PICCINI, C.; ZUNINO, P. American foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to Oxytetracycline. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 176-177, 2001.
- POSYNIAK et al. Sulfonamide residues in honey. Control and development of analytical procedure. **Apiacta**, v. 38, p. 249-256, 2003.
- QIU et al. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2760, 1999.

- SALINAS et al. Simultaneous determination of sulfathiazole and oxytetracycline in honey by derivative spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 43, n. 2, p. 244-252, 1991.
- SALTER, R. CHARM II system-Comprehensive residue analysis system for honey. **Apiacta**, v. 38, p.198-206, 2003.
- SCORTICHINI et al. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, p. 43-48, 2005.
- SHEN, H.; JIANG, H. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UV, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 535, p. 33-41, 2005.
- SHETH, H.B.; SPORNS, P. Enzyme immunoassay for screening of sulfathiazole in honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 73, n. 6, p.871-874, 1990.
- SILVA, T.G.R.; MIRANDA, S.H.G. A febre aftosa e os impactos econômicos no setor de carnes. Disponível em:< http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/Artigo_febre_aftosa.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2009.
- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de Produtos Veterinários SINDAN**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>>. Acesso em: 21 Jun. 2009.
- STEINKRAUS, K.H.; MORSE, R.A.. Media for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. **Acta Biotechnologica**, v.16, n. 1, p. 57-64, 1996.
- THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p. 168-176, 2005.
- THOMSON, C.A.; SPORNS, P. Direct ELISAs for sulfathiazole in milk and honey with special emphasis on enzyme conjugate preparation. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 2, p. 409-415, 1995.
- TURNIPSEED et al. Confirmation multiple phenicol residues in honey by electrospray LC/MS. **US Food and Drug Administration Laboratory Information Bulletin N° 4281**, v.18, n. 5, p. 1-10, 2002.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - Beltsville Agricultural Research Center. American Foulbrood Disease. Disponível em: <<http://www.barc.usda.gov/psi/brl/bd-amfb>>. Acesso em: 22 ago. 2004.

- VERZEGNASSI et al. Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 4, p. 335-342, 2003.
- VERZEGNASSI et al. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. **Journal of Chromatography A**, v.977, n. 1, p.77-87, 2002.
- VIÑAS et al. Liquid chromatographic analysis of sulfonamides in foods. **Chromatographia**, v. 40, n. 7-8, p. 382-386, 1995.
- VIÑAS et al. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, p. 125-129, 2004.
- WAN et al. Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with potassium permanganate-sodium sulfite- β -cyclodextrin chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 824, p. 57-64, 2005.
- WILSON, B. 45 Years of foulbrood. **Bee Culture**, v.128, n. 10, 2000. Disponível em: <<http://bee.airoot.com/beeculture/months/00oct/00oct3.html>>. Acesso em 21 ago. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. **Fifty-eighth report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Technical Report Series 911, 2002. Disponível em:< http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_911.pdf>. Acesso em 28/11/2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneve, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>. Acesso em 14/11/2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives. **Thirty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 25, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives. **Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 33, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **Forty-eigh meeting of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 39, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **Fiftieth meeting of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 41, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **Sixty-second meeting of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneve. Food Additives Series N° 53, 2005.

CAPÍTULO 2

A HPLC METHOD WITH FLUORESCENCE DETECTION FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE RESIDUES AND EVALUATION OF THEIR STABILITY IN HONEY

**Artigo submetido para publicação na revista
*Food Control***

A HPLC method with fluorescence detection for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey.

Abstract

This study aimed to develop and validate a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline residues in honeys with fluorescence detection. Sample preparation was done in a single solid phase extraction step. The chromatographic separation was carried out in a C₈ column and peaks presented good resolution. Matrix matched calibration curves were able to quantify residues at concentration levels between 25 - 500 µg kg⁻¹ with good linearity and precision. Limits of detection and quantitation were between 6 - 8 µg kg⁻¹ and 19 - 25 µg kg⁻¹, respectively. The method was applied to 20 honey samples of different regions of Brazil and floral origins. The stability of tetracyclines in honey was evaluated during 60 days of storage and confirmed the concerns with antimicrobial residues in honey.

Keywords: honey, tetracyclines, stability.

Introduction

Tetracyclines (TCs) are antimicrobial substances that have been used worldwide in apiculture as prophylactics or therapeutics agents in the prevention and treatment, respectively, of bacterial diseases such the American Foulbrood (AFB) and the European Foulbrood (EFB). Residues of these veterinary drugs can be found in honey after beehive treatment (Thompson et al., 2005; Martel, Zeggane, Drajnudel, Faucon and Aubert, 2006), exposing consumers to the risks associated with ingestion of these contaminants, like allergic reactions. Non-human usage of antimicrobials has also an impact on the occurrence

of resistant bacteria in animals and foods (World Health Organization, 2003). Due to these problems, some countries have established maximum residue limits (MRL) for TCs in honey, while others do not tolerate any residue level. The presence of antimicrobial residues in honey is a hurdle to the international trade of the product. Since Brazil became an important honey exporter, producers, authorities and researches are more concerned about the problem and have taken efforts to avoid honey contamination and, consequently, improve apiculture in the country. The Brazilian National Program for Honey Residues Control considers tetracycline's residues as the sum of the three relative drugs, oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC). The program establishes a MRL for TCs in honey of $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Brasil, 2006). The Joint Food and Agriculture Organization (FAO) / World Health Organization (WHO) Expert Committee on Food Additives (JECFA) also consider the sum of the three drugs residues to specify the Acceptable Daily Intake (ADI) for the TCs as 0-30 μg per kg of body weight (World Health Organization, 1998).

Chromatographic analysis of TCs in foods involves problems of analytes recovery from the matrix and peak resolution. The main causes are the interaction of the silanol groups in the silica-based columns with highly polar groups distributed on the analyte molecules and the formation of metal chelates in the matrix and in the chromatographic system. These problems have been surpassed by the use of end-capped modified silica columns, synthesized from 99.99% pure silica, the development of new columns with polymeric packing materials, free of silanols, the use of oxalic acid in the mobile phase and the use of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in the extraction buffer and in the SPE

conditioning step (Fedeniuk and Shand, 1998; Oka, Ito and Matsumoto, 2000; Anderson, Rupp and Wu, 2005; Huq, Garriques and Kallury, 2006).

In the last 20 years, some methods using HPLC have been reported as the most suitable technique for the determination of TCs in honey, including HPLC with mass spectrometry (Oka et al., 1994; Nakazawa, Ino, Kato, Watanabe, Ito and Oka, 1999; Kaufmann, Roth, Ryser and Widmer, 2002; Alfredsson, Branzell, Granelli and Lundström, 2005; Khong, Hammel and Guy, 2005; Carrasco-Pancorbo, Terrones, Segura-Carretero and Fernández-Gutiérrez, 2008; Debayle, Dessalces and Grenier-Loustalot, 2008; Hammel, Mohamed, Gremaud, LeBreton and Guy, 2008; Lopez, Pettis, Smith and Chu, 2008), HPLC with chemiluminescence detection (Wan, Cui, Zheng, Zhou, Liu and Yu, 2005) and HPLC with ultra-violet (UV) detection (Oka, Ikai, Kawamura, Uno and Yamada, 1987; Diaz, Cabanillas and Salinas, 1990; Pagliuca, Gazzoti, Serra and Sabatini, 2002; Diegez, Soraci, Bedascarrasbure and Libonatti, 2004; Viñas, Balsalobre, López-Eroz and Hernandez-Córdoba, 2004; Martel et al. 2006; Li et al., 2008). Although TCs exhibit fluorescence (Anderson et al. 2005), this property has not been frequently used in the development of HPLC methods for the determination of TCs in honey. Pena, Pelantova, Lino, Silveira and Solich (2005) reported a method using fluorescence detection for the determination of OTC and TC in honey. The post-column effluent was mixed with magnesium acetate solution to promote complex formation between magnesium ions and TCs, increasing the fluorescence of the analytes. Recently, Fujita, Ito, Ishihara, Inukai, Tanaka and Taniguchi (2008) reported a method with fluorescence detection for OTC, TC and CTC in honey using an isocratic mobile phase and no post column reaction for

fluorescence enhancement. Both methods reported an extensive sample preparation procedure with at least two sequential clean-up steps using SPE polymeric cartridges and metal chelate affinity chromatography to obtain a suitable final extract.

The aim of this work was to develop a method for simultaneous determination of OTC, TC and CTC residues in honey using HPLC with fluorescence detection using simple sample preparation techniques and no post column reaction. The method was applied to different honey types and used to evaluate tetracycline residue stabilities during honey storage.

Experimental

Materials and reagents

Chlortetracycline (CTC), doxycycline (DC) and tetracycline hydrochloride (TC) standards were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and OTC dihydrate standard was purchased from ICN Biomedicals (Aurora, USA). Stock solutions containing 1 mg mL⁻¹ of each drug were prepared in methanol and stored at -18°C (Liang Denton and Bates, 1998).

Mobile phase A was an aqueous solution containing 0.075 mol L⁻¹ sodium acetate dihydrate (J.T.Baker, Xalostoc, Mexico), 0.035 mol L⁻¹ calcium chloride dihydrate and 0.025 mol L⁻¹ ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Na₂EDTA.2H₂O)-Titriplex® III with the pH corrected to 6.5 with 5 mol L⁻¹ sodium hydroxide solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) using a Digimed DM 20 pHmeter (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brazil). Mobile phase B was HPLC grade methanol (Tedia

Company, Inc., Fairfield, USA) with 5% Milli-Q[®] water (Millipore, Molsheim, France). Both mobile phases were filtered through 0.45 µm membranes (Sartorius AG., Goettingen, Germany) and degassed for 5 minutes in an ultrasonic bath (Thornton Eletrônica Ltda., Vinhedo, Brazil) under vacuum.

McIlvaine buffer (pH 4.0) was prepared using 0.1 mol L⁻¹ citric acid solution (Merck S.A., Rio de Janeiro, Brazil) and 0.2 mol L⁻¹ sodium phosphate dibasic heptahydrate (Ecibra, São Paulo, Brazil). The extraction buffer was prepared by dissolving 37.22 g of Na₂EDTA (Titriplex[®]) in one liter McIlvaine buffer (pH 4.0). Acetonitrile, HPLC grade, was purchased from Jt Baker (J.T.Baker, Xalostoc, Mexico) and ethyl acetate suitable for pesticide residue analysis was purchased from Mallinckrodt Baker (Paris, USA). Octadecyl (C₁₈) solid phase extraction cartridges (500 mg, 3 mL) were from Varian (Lake Forest, USA) and the manifold was a Visiprep[™] (Supelco, Bellefonte, USA). Final extracts were filtered through 0.45 µm syringe filters (Millipore, São Paulo, Brazil).

HPLC equipment and chromatographic conditions

The chromatographic system was constituted of a Waters In-Line Degasser, a Waters 600E Multisolvent Delivery System operated by the Millennium³² Software (Waters, Milford, USA), equipped with a Rheodyne 7725i manual injector (Rheodyne, Rohnert Park, USA) with a 50 µL loop. Analytical (4.6 x 250 mm, 5 µm) and guard (4.6 x 12.5 mm, 5 µm) columns were Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies, Wilmington, USA). Mobile phase flow rate was 1.0 mL min⁻¹, with mobile phase B increasing linearly from 30% to 50% in 13 minutes, keeping these proportions until 15

minutes and then returning to the original conditions in 5 minutes. A three minutes pause was then observed before the next injection to equilibrate the column.

Detection used a Shimadzu RF-10A spectrofluorometric detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) operating at an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 512 nm. The results were recorded and processed by a Waters 746 Computing Integrator (Thermo Separation Products, San Jose, USA).

Sample preparation procedure

Three grams of honey were weighted into 50 mL polyethylene centrifuge tube and 60 μL of a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ doxycycline solution were added as internal standard. Then, 15 mL of McIlvaine buffer (pH 4.0) with 0.1 mol L^{-1} Na_2EDTA were added and the mixture was vortexed until the honey dissolved completely. The SPE cartridge was conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of McIlvaine buffer (pH 4.0) containing 0.1 mol L^{-1} Na_2EDTA . After condition, 5 mL of sample were allowed to pass through the cartridge followed by 2.5 mL of McIlvaine buffer (pH 4.0): methanol (85:15, v/v) and 2.5 mL of water. The cartridge was dried for 2 minutes by aspiration using a negative pressure in the manifold chamber (40 kPa) and another washing step with 2.5 mL acetonitrile was done. Cartridge was dried again for one minute and analytes were eluted with 3.0 mL of ethyl acetate:methanol (75:25, v/v). The elution mixture was evaporated until dryness under a nitrogen stream in a water bath (30-35 $^{\circ}\text{C}$) and the sample was dissolved in 150 μL of methanol and 850 μL of water. The sample was filtered and 50 μL were injected onto the HPLC.

Samples

Five kilograms of multiflower honey, free of antimicrobials, were supplied by a producer located in Campos do Jordão - SP and it was used to develop the method and in the TC stability tests. Twenty samples from different floral origins (orange, multi-flower and eucalyptus) and regions of Brazil (south, south-east, north-east and 2 samples without declared origin in the label) were purchased in the retail market of Campinas-SP.

Method validation

The method was in-house validated by the evaluation of the following performance parameters: limits of detection and quantitation, linearity, precision, recovery and specificity.

Stability of TCs in honey

A blank honey portion was fortified at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ with OTC, TC and CTC and stored in a clear plastic container at ambient temperature (20-30 °C). The sample was exposed simultaneously to indirect sun light through the laboratory windows and to artificial fluorescent light for about 10 h per day during 60 days. Three aliquots were analyzed by the proposed method at the day of fortification (day 0) and after 1, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days of storage.

Results and discussion

Method development

Chromatographic conditions. The mobile phase was based on the one used by Houghlum and Larson (1997) in the assay of chlortetracycline in animal feeds by HPLC with fluorescence detection. The original concentrations of sodium acetate and calcium chloride were reduced without changes in the fluorescence intensity of the TCs, although, this mobile phase still contains relatively high amounts of salts and its pH is too high to be used in conventional reversed phase analytical columns using modified silica. The initial mobile phase tests were conducted using a new C₈ column (not end-capped), but the separation efficiency decreased in a short period of use. Thus, it was decided to use a column that resists mildly acidic conditions. A gradient elution was developed because the TCs showed very different chromatographic behavior. A lower methanol content in the mobile phase was used to delay OTC elution, allowing its separation from interferents, while a higher proportion was necessary to reduce the CTC retention time and to improve its resolution. Average retention times (minutes) were 5.2 (s=0.05) for OTC, 9.9 (s=0.15) for DC (IS), 13.4 (s=0.10) for TC and 19.2 (s=0.14) for CTC (Figure 1).

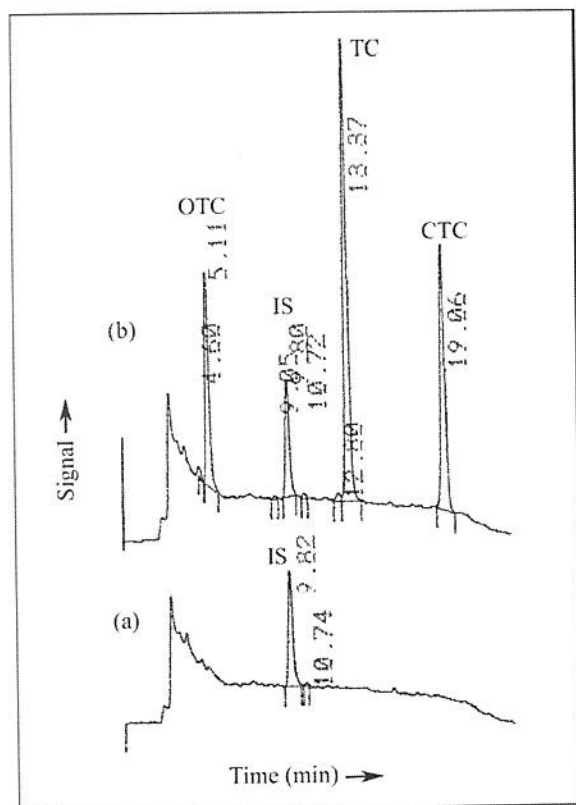


Figure 1. (a) Blank sample with $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ of doxycycline (IS) using pH 6.5 mobile phase; (b) honey sample fortified with $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ of oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC) with pH 6.5 mobile phase.

Three pH values of the mobile phase were tested to evaluate the response intensity (analyte area / internal standard area) of a $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ fortified sample in comparison to pH 6.5. At pH 4.0, analytes showed no fluorescence. At pH 6.0, the average responses for OTC, TC and CTC were reduced by 36 %, 26 % and 3 %, respectively. When the pH of the mobile phase was increased to 6.9, responses did not show significant changes ($\alpha=0.05$).

The fluorescence intensity was studied by the injection of TC standards into the chromatographic system setting different combinations of the excitation and emission wavelengths. An excitation wavelength of 390 nm and emission wavelength of 512 nm

(Houglum and Larson, 1997) were considered as reference and the relative detector responses for another eight combinations are shown in Figure 2.

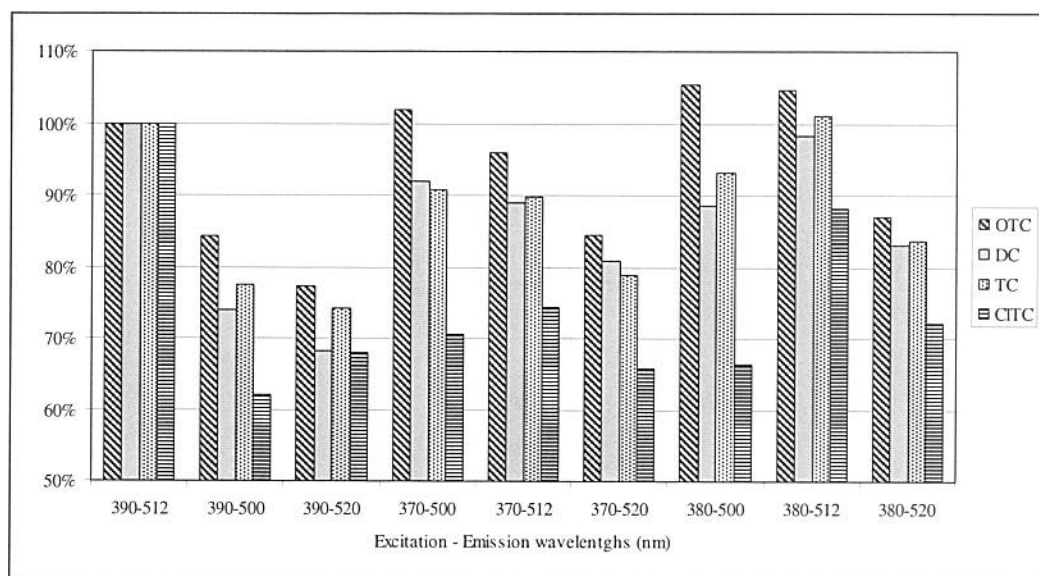


Figure 2. Relative intensities of tetracycline fluorescence in the mobile phase using different combinations of excitation and emission wavelengths, compared to the reference binomial 390 - 512 nm.

Sample preparation. The development of the sample preparation procedure started based on the work described by Oka et al. (1994). An experimental design was used to evaluate the influence of the following parameters on the extraction efficiency: sample dilution solvent (water or McIlvaine buffer pH 4.0 with EDTA), volume of sample dilution solvent (10 or 20 mL), SPE conditioning solvent (water or McIlvaine buffer pH 4.0 with 0.1 mol L⁻¹ EDTA), sample volume applied to SPE (2.5 or 5.0 mL), volume and methanol content of the solution used in the SPE washing step (2.5 or 5.0 mL; water:methanol or McIlvaine buffer pH 4.0:methanol) and SPE elution solvent (methanol or ethyl acetate:methanol). However, the established SPE parameters did not promote the same

sample cleaning efficiency when a different SPE cartridge lot was used. To solve this problem, a new washing step with acetonitrile was introduced in the SPE clean-up procedure, based in a negative result reported by Viñas et al. (2004). Thereby, it was possible to remove the interferents from the beginning of the chromatogram and eliminate most of the water residues from the cartridge, which promoted faster evaporation of the final extract under a nitrogen flow.

The extraction efficiency of TCs from honey was studied using different pH value for the McIlvaine extraction buffer. TCs are anfoteric compounds and an overall null charge of the molecules is expected when the pH of the medium is between pKa1 and pKa2 values, which range from 2.9 to 3.6 and 7.4 to 7.8, respectively, for OTC, TC and CTC (Qiang and Adams, 2004). Consequently, a higher retention of the TC molecules in SPE cartridges would be expected using McIlvaine buffer at pH 5.0. However, when the extraction procedure using McIlvaine buffer at pH 5.0 was applied to fortified samples, in comparison to pH 4.0 buffers, the average extraction efficiencies were reduced 31%, 55% and 32% for OTC, TC and CTC, respectively.

Validation

Specificity was confirmed by the absence of interfering peaks in the retention time windows of OTC, TC and CTC, calculated as $\pm 2.5\%$ of the relative retention times for TC (EC, 2002). These time windows were also used in the analysis of 20 blank samples to determinate limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), considering 3.3 SD/slope and 10 SD/slope, respectively (Table 1), where SD is the standard deviation of the blank

responses. Since LOQ values obtained were close and much lower than the MRL, the initial point for the calibration curves was taken as the highest LOQ determined as a common value for all TC.

Calibration curves were constructed by fortifying honey blank samples (triplicates) with OTC, TC and CTC at 6 levels: 25, 50, 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. DC was used as internal standard and added to each sample at 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Mathematical formulas of the curves, correlation coefficients (r^2) for the linear regression and acceptability ranges for the parameters of the curves were obtained using the software GraphPad PRISM[®] version 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) (Table I). The construction of calibration curves fortifying the matrix with TC standards and the use of an internal standard were important to correct deviations that occur during sample preparation and analysis. This procedure provided good linearity in the concentration ranges studied and avoided the use of correction factors for the residue level determinations.

Table I. LOD, LOQ, working ranges, calibration curves parameters and correlation coefficients (r^2) for the linear regression.

Analyte	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Working range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Slope $\pm$ SD	Intercept $\pm$ SD	r^2
OTC	8	25	25-500	0.0139 $\pm$ 0.0002	-0.0352 $\pm$ 0.0717	0.9966
TC	6	19	25-500	0.0132 $\pm$ 0.0005	0.3369 $\pm$ 0.1247	0.9946
CTC	7	22	25-500	0.0089 $\pm$ 0.0003	0.1412 $\pm$ 0.0845	0.9945

Precision, expressed as coefficient of variation (CV%), and recovery (%) were calculated by fortifying blank samples to yield concentrations equivalent to 0.5, 1 and 1.5 times the MRL for TCs (Table II).

Table II. Intra-day and inter-day recoveries (%) and precisions (CV%) for the determination of OTC, TC and CTC in honey samples fortified in three different levels.

Fortification level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Tetracyclines	Intra-day			Inter-day (n=9)
			Day one (n=3)	Day two (n=3)	Day Three (n=3)	
100		OTC	102	90	109	100
			5	3	3	9
	Recovery (%)	TC	102	86	102	97
		CV (%)	8	8	5	10
		CTC	101	102	98	101
			4	8	4	5
200		OTC	98	101	95	98
			1	7	3	5
	Recovery (%)	TC	96	104	93	98
		CV (%)	4	10	2	8
		CTC	92	111	90	98
			7	3	7	11
300		OTC	95	98	100	98
			5	5	8	6
	Recovery (%)	TC	111	90	110	104
		CV (%)	4	5	3	11
		CTC	108	101	105	105
			5	9	4	6

Tetracycline stabilities in honey

The residue levels of OTC, TC and CTC in a honey sample fortified at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, after 60 days of storage, were reduced 97 %, 76 % and 71 %, respectively (Figure 3). The OTC concentration at day 60 was calculated by extrapolation of the calibration curve, since it was detected below the LOQ.

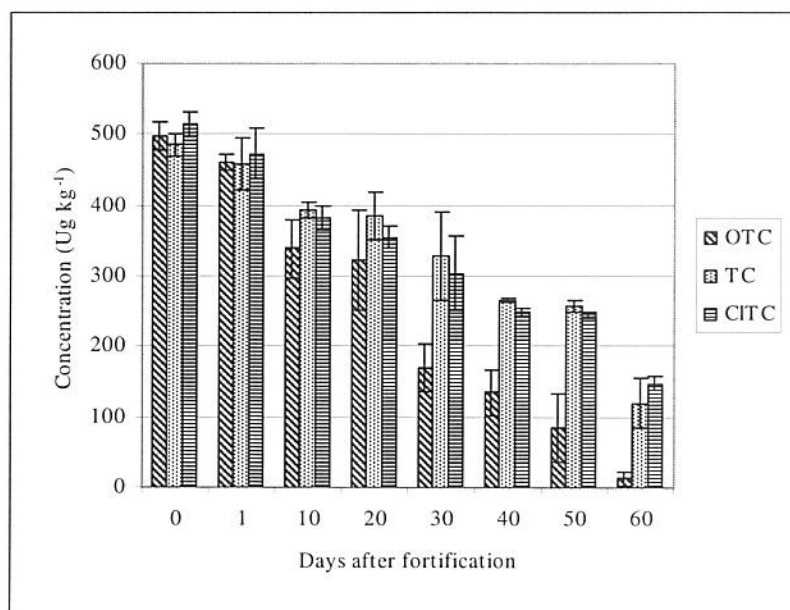


Figure 3. Determination of tetracycline residue levels after fortification of a blank sample with standards at 500 µg kg⁻¹ during 60 days of storage.

However, it is not possible to conclude that, after this period, honey is free of OTC related problems. Some authors reported the occurrence of biologically active impurities and degradation products of TCs during sample preparation and storage, especially TC epimers (Khong et al., 2005; Alfredsson et al., 2005; Kaufmann et al. 2002). During the stability test, it was possible to note a peak, eluting just before OTC, which had its signal increased inversely to the decrease of OTC content (Figure 4). A smaller peak was also noted at day zero but not in the blank sample chromatograms. These characteristics and the data reported by the authors cited above let us to assume that this peak was suspected of being epi-oxytetracycline (epi-OTC). Since we did not have an epi-OTC standard to confirm the peak identity, this hypothesis could not be rejected and additional studies are recommended. No similar results were observed for TC and CTC, even though they are also susceptible to epimerization.

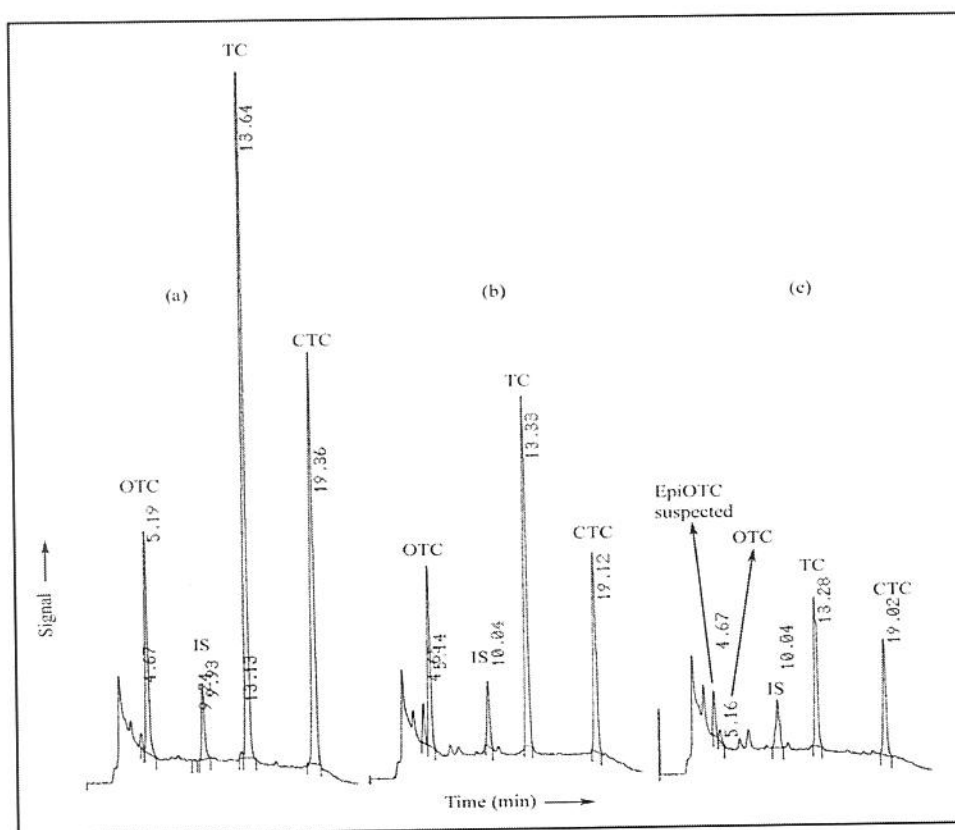


Figure 4. Chromatograms of honey samples fortified with TCs at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ and analyzed after 0 (a), 30 (b) and 60 days (c) of storage at ambient temperature. The peak before OTC is suspected of being epiOTC.

Martel et al. (2006) studied the stability of TC in honey and reported a half-life of 121 days for this compound (at 35°C in the dark), a value much higher than the 50 days obtained in this study. The stabilities of TCs in pure standard solutions and in the final extracts obtained after sample preparation of honey blank samples were evaluated by Khong et al. (2005). These authors studied different storage conditions. Even though the stability results reported for the TCs in the final extracts were important for laboratory logistics, it could not be used for comparison with stability in real honey samples because they were specific for the extract composition. The half-life values for the TC and CTC

standard solutions (at 20 °C in the dark) were similar to the ones obtained in our study for the stability in honey, between 40 and 50 days. On the other hand, the authors reported that OTC was stable in standard solutions up to 11 weeks, while in our study OTC presented the worst stability in honey among the three drugs studied.

Retail sample analysis

Twenty honey samples from different regions of Brazil (south, south-east and north-east) and three different floral origins (eucalyptus, orange and multi-flower) were analyzed using the developed method. No significant interfering peaks were detected as possible interferents. The results shown that the method was suitable for the samples tested and could be applied to different honey types. Orange and multi-flower honeys were lighter in color than eucalyptus honey, but chromatograms for the final extracts of these three honey types did not presented great differences (Figure 5).

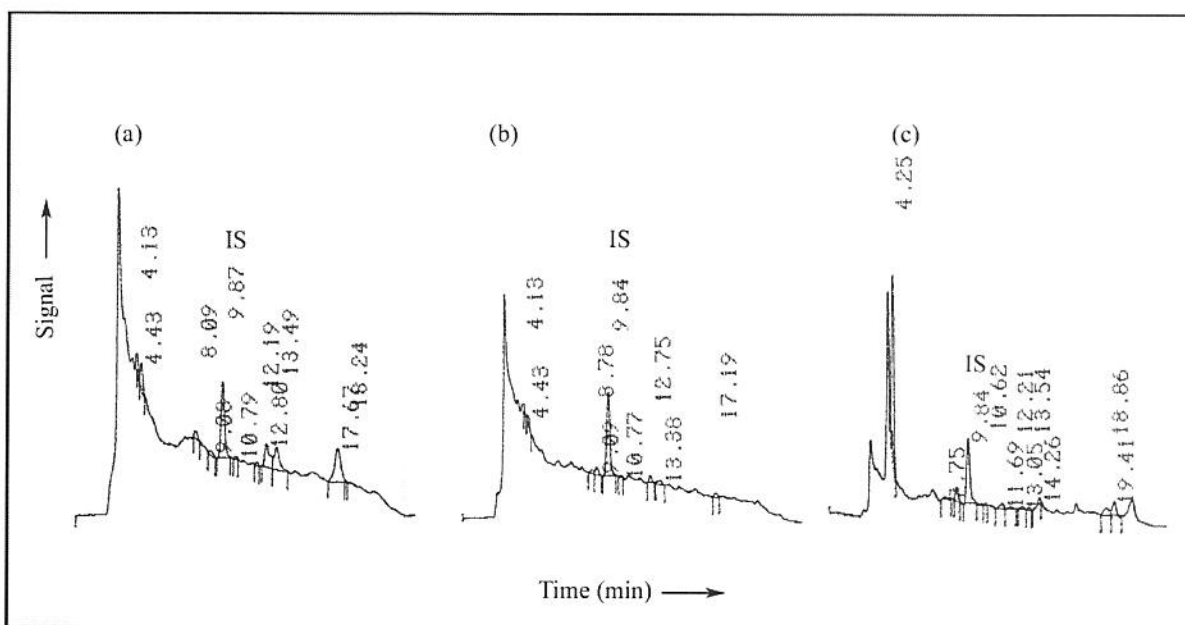


Figure 5. Chromatograms of orange-flower (a), multi-flower (b) and eucalyptus (c) honey type samples analyzed by the method.

Conclusion

The method developed was suitable for the simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in honeys from different floral origins using fluorescence detection with no post column reaction or derivatization. Its simplicity facilitates the implementation of monitoring programs in surveillance laboratories equipped with standard chromatographic equipment. The sample preparation procedure used common C₁₈ SPE cartridges, a single extraction-clean-up step. The construction of the calibration curves by honey fortification with the analyte standards promoted good linearity and precision, avoiding the use of correction factors to quantify these antimicrobials in honey. Chlortetracycline and tetracycline showed higher stability than oxytetracycline when submitted to the storage conditions specified in this study, but the combination of their residues remained above the MRL even after 60 days. This fact reinforces the importance of monitoring programs to protect consumer's health and honey's image of being a natural product. More investigations are necessary to identify tetracycline epimers.

References

- Alfredsson, G., Branzell, C., Granelli, K., Lundström, A°. (2005). Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. *Anal Chim Acta*, 529, 47-51.
- Anderson, C.R., Rupp, H.S., Wu, W-H. (2005). Complexities in tetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatogr. A*, 1075, 23-32.

- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2006). Portaria Nº50 de 20 de fevereiro de 2006. DOU, 43, 15-25.
- Carrasco-Pancorbo, A., Casado-Terrones, S., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2008). Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet and electrospray time-of-flight mass spectrometry on-line detection for the separation of eight tetracyclines in honey samples. *J. Chromatogr. A*, 1195, 107–116.
- Debayle, D., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F. (2008), Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem.* 391, 1011–1020.
- Diaz, T.G., Cabanillas, A.G., Salinas, F. (1990). Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography. *Anal Letters*, 23(4), 607-616.
- Diegez, S., Soraci, A., Bedascarrasbure, E., Libonatti, C. (2004). Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina em miel. *Rev Investig Agropec.*, 31(1), 159-166.
- European Communities-EC, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun., (2002) L221/8-L221/36.
- Fedeniuk, R.W., Shand, P.J. (1998). Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *J Chromatogr A.*, 812, 3-15.
- Fujita, K., Ito, H., Ishihara, M., Inukai, S., Tanaka, H., Taniguchi, M. (2008) Analysis of trace residues of tetracyclines in dark-colored honeys by high-performance liquid chromatography using polymeric cartridge and metal chelate affinity chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 49 (3), 196-203.
- Hammel, Y.A., Mohamed, R., Gremaud, E., LeBreton, M.H., Guy, P.A. (2008). Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1177, 58-76.

- Houglum, J.E., Larson, R.D. (1997). Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *J AOAC Int.*, 80 (5), 961-965.
- Huq, S., Garriques, M., Kallury, K.M.R. (2006). Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean-up of tetracycline and oxytetracycline from honey. *J Chromatogr A.*, 1135, 12-18.
- Kaufmann, A., Roth, E., Ryser, B., Widmer, M. (2002). Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *J AOAC Int.*, 85(4), 853-860.
- Khong, S., Hammel, Y., Guy, P.A. (2005). Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 493-502.
- Li, J., Chen, L., Wang, X., Jin, H., Ding, L., Zhang, K., Zhang, H. (2008) Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 75, 1245-1252.
- Liang, Y., Denton, M.B., Bates, R.B. (1998). Stability studies of tetracycline in methanol solution. *J Chromatogr A.*, 827, 45-55.
- Lopez, M., Pettis, J., Smith, I. B., Chu, P. (2008). Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *J.Agric. Food Chem.*, 56, 1553-1559.
- Martel, A.C., Zeggane, S., Drajnudel, P., Faucon, J.P., Aubert, M. (2006). Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Add. Cont.*, 23(3), 265-273.
- Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., Oka, H. (1999). Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.*, 732, 55-64.

- Oka H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M. (1987). Improvement of chemical analysis of antibiotics: IX. A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system. *J Chromatogr.*, 389, 417-426.
- Oka, H., Ikai, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Asukabe, H., Suzuki, M., Himeji, R., Horie, M., Nakazawa, H., Macneil, J.D. (1994). Improvement of chemical analysis of antibiotics. 22. Identification of residual tetracycline in honey by frit FAB/LC/MS using volatile mobile phase. *J. Agric Food Chem.*, 42, 2215- 2219.
- Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A.* 882, 109-133.
- Pagliuca, G., Gazzoti, T., Serra, G., Sabatini, A.G. (2002). A scientific note on the determination of oxitetracycline residues in honey by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Apidol.*, 33, 583-584.
- Pena, A., Pelantova, N., Lino, C.M., Silveira, M.I.N., Solich, P. (2005). Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *J. Agric Food Chem.*, 53(10), 3784-3788.
- Qiang, Z., Adams, C. (2004). Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res.*, 38(12), 2874-2890.
- Thompson, H.M., Waite, R.J., Wilkins, S., Brown, M.A., Bigwood, T., Shaw, M., Ridgway, C., Sharman, M. (2005). Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood. *Food Add. Cont.*, 22(6), 573-578.
- Viñas, P., Balsalobre, N., López-Erroz, C., Hernandez-Córdoba, M. (2004). Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *J Chromatogr A.*, 1022, 125-129.
- Wan, G., Cui, H., Zheng, H., Zhou, J., Liu, L., Yu, X. (2005). Determination of tetracyclines residues in honey using high-performance liquid chromatography with

potassium permanganate-sodium sulfite- β -cyclodextrin chemiluminescence detection.
J Chromatogr B. 824, 57-64.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1998). Evaluation of certain veterinary drug residues in food: Fiftieth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series, 888, 50-54.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2003). Report of the joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Scientific assessment, Geneva, 2003. Available at:
<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>. Accessed on 14/11/2005.

CAPÍTULO 3

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY- TANDEM QUADRUPOLE-TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF SULFONAMIDES AND CHLORAMPHENICOL IN HONEY.

Artigo submetido para publicação na revista

Talanta

High performance liquid chromatography-tandem quadrupole-time of flight mass spectrometry for determination of sulfonamides and chloramphenicol in honey.

Abstract

A high performance liquid chromatography-tandem quadrupole-time of flight mass spectrometer (LC-Q-ToF/MS) method was developed to determine three sulfonamides (sulfathiazole, sulfamethazine and sulfadimetoxine) and chloramphenicol residues in honey. Liquid-liquid and solid phase extraction techniques were combined to achieve a simple sample preparation procedure, which was suitable for analyte extraction and sample clean-up. Separation of the analytes was conducted in a C₁₈ reversed phase chromatographic column using different mobile phases for chloramphenicol and the sulfonamides. An electrospray ionization source interfaced the high performance liquid chromatography equipment to Q-ToF/MS, which was programmed to induce the formation of positive and negative m/z ions that were monitored in full scan and selected ion monitoring modes. Quantification was done by matrix-matched calibration curves using common and deuterated labeled internal standards. Molecular ions were fragmented by collision-induced dissociation. The molecular ion chromatogram and mass spectra with precursor and product ions were used for confirmation of the antimicrobials in accordance to the criteria established by Commission Decision 2002/657/EC. The method was in-house validated and performance characteristics were satisfactory. The LC-Q-ToF/MS type equipment proved to be suitable for accurate quantification and reliable confirmation of sulfonamides and chloramphenicol residues in honey due to highly accurate m/z measurements.

Keywords: sulfonamide, chloramphenicol, honey, time-of-flight, mass spectrometry, veterinary drug.

Introduction

Apiculture is subject to attacks of plagues, which impair productivity of the apiary and, consequently, affect the revenue of the producer. To keep the infestation under control, producers utilize beehive management techniques and veterinary drugs [1]. Among them, sulfonamides (SAs) and chloramphenicol (CAP) are antimicrobial substances used appropriately, or not, in the prevention and treatment of honeybee diseases. Unfortunately, residues of these substances have been detected in honey and, consequently, consumers can be exposed to these chemical hazards [2-10]. Another critical problem related to the presence of veterinary drug residues in honey is the potential of inducing resistance to these antimicrobials in pathogen microorganisms that are present in humans and in the environment [11].

The Brazilian 2008 Monitoring Program for Residues in Honey [12] establishes a maximum residue limit (MRL) of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SAs, considering as the total SA amount the sum of the related drugs. The program has adopted the value of $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ as the CAP MRL, which had been previously established by the European Community Commission as the Minimum Required Performance Limit (MRPL) for this unauthorized substance [13].

In the last 20 years, high performance liquid chromatography (HPLC) has become the most used separation technique for quantitative determinations of SAs and CAP residues in

honey. Different detection techniques have been combined with HPLC, such as single ultraviolet wavelength and photodiode array detectors [14-21], fluorescence with pre-column or post-column derivatizations [10, 22-25] and mass spectrometry [2-10, 26-38]. Nowadays, HPLC coupled with mass spectrometric detectors (MS) have become one of the most important tools for the determination of veterinary drug residues in honey and other matrices due to the high selectivity and detectivity, as well as the quantification and confirmation capacities of the technique. Among the existing MS instruments, the triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer was used in the great majority of the reported methods for the determination of antimicrobials in honey.

The quadrupole time-of-flight (Q-ToF/MS) mass spectrometer is an instrument that has been used for structure elucidation and confirmation purposes [39, 40]. It consists of a quadrupole for MS1 plus a collision region tandem to an orthogonal time-of-flight mass analyzer (ToF/MS) for MS2. LC-Q-ToF/MS uses the same atmospheric pressure ionization (API) sources as QqQ and ion-trap (IT) instruments. The Q-ToF/MS has the capability for the single MS acquisition approach when the first quadrupole is operated in band pass mode and the analysis is performed at full scan mass mode on the "high end" ToF/MS. For MS/MS acquisitions, a precursor-ion is selected by the quadrupole and fragmented in the collision cell by collision-induced dissociation (CID). Then, precursor and products ions are analyzed in the ToF/MS. It does not present pure multiple reaction monitoring (MRM) capability. However, it can provide high resolution mass analysis, allowing more accurate identification of the m/z ions and, consequently, reliability in the confirmation of the residue or contaminant.

This work aimed to develop a method using LC-Q-ToF/MS to determine sulfathiazole (STZ), sulfamethazine (SMZ), sulfadimethoxine (SDM) and CAP in honey. The method includes a sample preparation procedure to simultaneously extract SAs and CAP from honey samples and to concentrate the analytes. An in-house validation was done in order to evaluate performance characteristics of the method. The suitability of the method for residue confirmation was tested considering the criteria adopted by the official laboratories in the European Community.

Material and Methods

Reagents and suppliers

STZ, SMZ, SDM, sulfamethoxazole (SMXZ) and CAP were analytical standards purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Deuterium-labeled chloramphenicol (98%) (CAP-d5) was from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA). The analyte stock solutions (1 mg mL⁻¹) were prepared in HPLC grade methanol (Tedia, Fairfield, USA) and stored at -18°C up to 30 days. Distilled water was purified by a Milli-Q[®] system (Millipore, Molsheim, France), acetonitrile (J.T.Baker, Xalostoc, Mexico) and dichloromethane (EMD, Gibbstown, USA) were HPLC grade. The following reagents were analytical grade: Hydrochloridic acid (Merck, Rio de Janeiro, Brazil), sodium acetate (J.T.Baker, Xalostoc, Mexico), sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany), anhydrous sodium sulfate (Merck, Rio de Janeiro, Brazil) and acetic acid (Merck, Rio de Janeiro, Brazil). Octadecyl (C₁₈) solid phase extraction (SPE) cartridges and bulk C₁₈ sorbent were from Varian (Harbor City, USA).

Sample preparation procedure

Five grams of honey were weighted into a 50 mL centrifuge tube. As internal standards, 250 μL of a SMXZ solution ($2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) and 60 μL of a CAP-d5 solution ($0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$) were added. Five milliliters of HCl (2 mol L^{-1}) were added and the tube was stirred until complete dissolution. The sample was kept in a water bath ($40\text{-}45^\circ\text{C}$) for 45 minutes to allow hydrolysis of the bound SAs [2, 3, 23, 25]. The pH was adjusted to 6.0 with the addition of 2.0 mL of sodium hydroxide (5 mol L^{-1}) and 800 μL of sodium acetate (1.2 mol L^{-1}). Two and a half grams of anhydrous sodium sulfate was added and a liquid-liquid (LLE) extraction was done with 15 mL of an acetonitrile:dichloromethane mixture (1: 3, v/v), shaking the tube gently for three minutes. The sample tube was centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm. The upper phase was collected in a 125 mL round bottom flask and the extraction was repeated with another 15 mL of the acetonitrile:dichloromethane mixture. The organic phases were combined and evaporated at $35\text{-}40^\circ\text{C}$ under vacuum in a rotatory evaporator (Tecnalise, Piracicaba, Brazil). Two milliliters of water were added to the flask and the sample was applied to a SPE cartridge (C18-500 mg/3 mL) pre-conditioned with 3 mL of methanol and 5 mL of water. The round bottom flask was washed twice with 1.0 mL water. The SPE was dried by aspiration operating the manifold at 40 kPa for 5 minutes. Analytes were eluted from the SPE with 5 mL of methanol. The solvent was evaporated under a nitrogen stream in a water bath ($35 - 40^\circ\text{C}$) and the extract was reconstituted in 50 μL of methanol and 250 μL of water. The sample was filtered through 0.45 μm MillexTM syringe filters (Millipore, São Paulo, Brazil). For the CAP and SAs analysis, 20 μL and 15 μL were injected into the chromatographic system, respectively.

LC-Q-ToF/MS

A Waters Alliance 2695 high-performance liquid chromatography system (Waters, Milford, USA) was interfaced to a Q-ToF Micro™ MS spectrometer (Micromass, Manchester, UK) through an electrospray ionization source (ESI). Chromatographic separation was achieved using a X-Terra® MS C₁₈ (150 x 2.1 mm, 5 µm) analytical column (Waters, Milford, USA) at a flow rate of 0.20 mL min⁻¹ for CAP and SAs. The mobile phase for the CAP analysis was an isocratic mixture of methanol:water (40:60, v/v). Total run time was 10 minutes (acquisition time from 4 to 8 minutes) and the mass detector was operated in negative mode (ESI⁻) with the following parameters: capillary voltage: 2000 V, sample cone voltage: 25 V and extraction cone voltage: 2 V. For the SAs, mobile phase was 1 % acetic acid in water and methanol, which were delivered in a gradient mode raising the methanol content linearly from 20 % to 50 % in 15 minutes. SAs were analyzed in the positive electrospray ionization mode (ESI⁺) and source parameters were: capillary voltage: 3000 V, sample cone voltage: 23 V and extraction cone voltage: 3V. Collision energy was set to zero during quantification analyses. Nitrogen was used as desolvation (500 L h⁻¹, 250°C) and cone (50 L h⁻¹) gases. The source temperature was set at 100 °C. Conditions were established by direct injection of standard solutions with a syringe pump.

Method validation

The method was in-house validated using the following performance characteristics: limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), linearity, intra-day and inter-day precision (repeatability), recovery, selectivity and ruggedness. For CAP, $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ was considered as the LOD and LOQ and tested for the signal to noise ratio (S/N) of 10:1. The LOD and LOQ for the SAs were determined considering the lowest concentration that promoted $S/N \geq 3$ and $S/N \geq 10$, respectively, when blank samples were fortified with the analytes at 5, 10, 15, 20 and $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Matrix-matched calibration curves were constructed fortifying blank honey samples at 5 levels: 20, 50, 100, 150 and $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ for SAs and 0.3, 0.45, 0.6, 1.0 and $3.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ for CAP. The peak area ratios of each molecular ion and its internal standard (response) were plotted against the respective concentration level. The linearity of the curves in the working range was evaluated by the correlation coefficient (r^2) of the lines obtained by the minimum square least method. Precision was expressed as the mean values encountered for 5 replicates in three different concentration levels (1, 1.5 and 2 times de MRPL for CAP and 0.5, 1.0 and 1.5 times de MRL for SAs) and the respective coefficients of variation (CV%), whereas trueness was determined by recovery tests. The precision and recovery tests were repeated on two other occasions to determine test repeatability. Chromatographic separation ruggedness for the SAs was evaluated through factorial experimental design. A two level-three factor experimental design was used to test response and retention time robustness. The tested parameters for

SAs were: mobile phase flow (0.19 to 0.21 mL min⁻¹), acetic acid content (0.9 to 1.1 %), and column temperature (29 °C to 31 °C).

In order to evaluate the matrix effect, six blank honey samples were processed by the extraction procedure previously described and the final extracts were diluted in a 16 % methanol in water solution containing the antimicrobials standards at concentrations equivalent to 1 µg kg⁻¹ for CAP and 100 µg kg⁻¹ for each sulfonamide. These extracts were analyzed and the averages were statically compared (*t* test) to those obtained for standard solutions.

Confirmation

To confirm the identity of the analytes, molecular *m/z* ion spectra acquired under full scan and selected ion monitoring (SIM) modes were compared to the respective isotope models created by the software Masslynx[®] 4.1 and to the mass spectra from solution standards. These molecular ions were selected as precursor ions and submitted to collision-induced dissociation (CID) in the collision cell using argon as the collision gas. The fragmentation extension control was made by the collision energy, which was set at 17 V for SAs and 10 V for CAP. The spectra were interpreted based upon the performance criteria for spectrometric detection established by Commission Decision 2002/657/EC [41].

Results and discussion

Sample preparation

While CAP has been reported to be easily extracted from an aqueous medium by LLE extraction [2, 4, 5], SAs show a more polar behavior and extraction depends strongly on the pH of the medium. However, pH 4.0, as suggested by Kaufmann [2] to control most of the SAs at their iso-electric point, did not promote good extraction for CAP in our conditions. The best results were obtained with pH of 6.0. In the LLE procedure, the addition of anhydrous sodium sulfate to the tube allowed the organic mixture to move to the upper phase so that it could be collected with a Pasteur pipette after centrifugation. In some samples, emulsion formation between the aqueous and organic phases was observed and the tube was submitted to ultrasound for about one minute in order to break it before centrifugation.

Sample clean-up was initially tested with Florisil SPE cartridges [15], which were prepared in the laboratory with bulk Florisil (60 - 100 mesh). Although this sorbent was appropriate to extract SAs and promoted satisfactory sample clean-up, it was not possible to retain CAP in the cartridge during the loading and washing steps even after different solvent tests. The use of C₁₈ sorbent in the SPE cartridges allowed the retention of all antimicrobials when these were taken up in water after solvent evaporation and loaded to SPE. The SPE cartridges used during development and validation of the method were both pre-packaged and filled with bulk C₁₈ sorbent in the laboratory.

LC-MS/MS analysis

The detection of CAP using an ESI source in the positive mode was reported by Nicolich *et al.* [42] in the analysis of milk samples using QqQ type equipment, which normally presents a higher sensitivity than Q-ToF when MRM mode is used [43]. Sheridan *et al.* [9] reported the use of an ESI source in the negative ionization mode for the simultaneous determination of SAs and CAP in honey, also with a QqQ mass spectrometer in the MRM mode. During the development of MS conditions for this study, CAP could not be detected in the positive mode at the desired level of $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Also, the tests to achieve deprotonation of SAs through negative ionization mode did not result in repeatable responses for precise determination of these antimicrobials. Therefore, the operation of the ESI source in both the positive and the negative ionization modes was necessary and it was decided to make two injections per sample. The change between ionization modes was set after each sample batch and calibration of the equipment was necessary when mass accuracy calibration test did not match the manufacturer's specification. The whole procedure took less than 15 minutes. SAs were completely separated with well resolved peaks and distinct retention times. These three compounds were chosen as representatives of the SA family because they enclose a wide mass range. More related compounds could be included by adjusting mobile phase gradient and column temperature, since there were relative large time windows between peaks. Even though SIM mode was used at each scanning time window to select the desired ions, lower signal to noise ratios were observed for SAs (ESI^+) than for CAP (ESI^-). Chromatograms of the SAs are shown in figure 1.

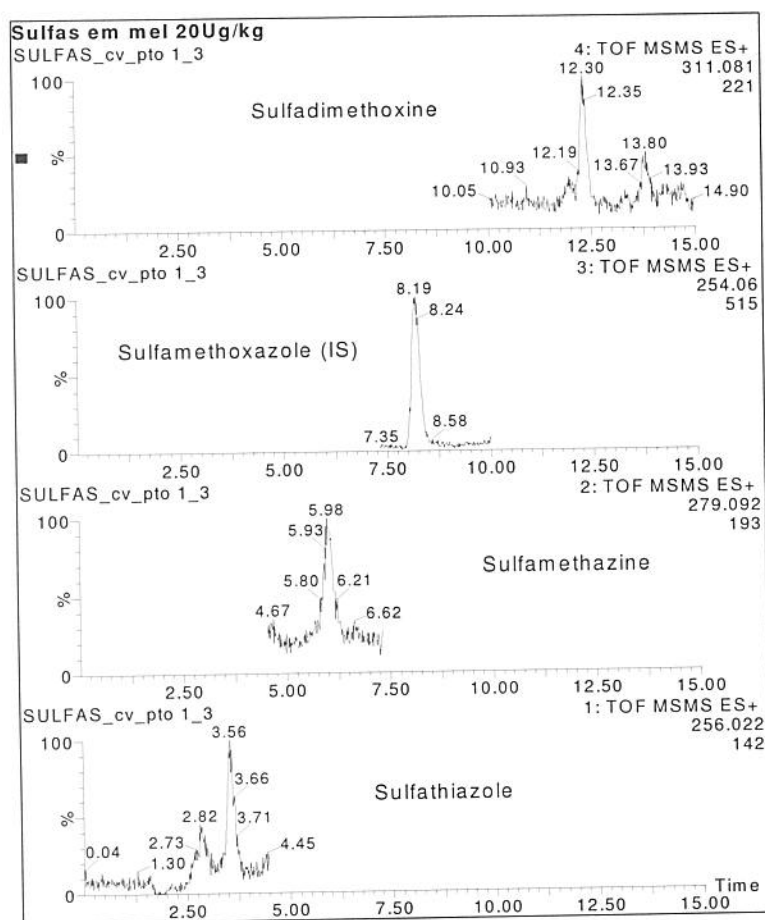


Figure 1. Chromatogram for a honey sample spiked with SDM, SMZ and STZ at $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ and sulfamethoxazole (IS) at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

The chromatographic separation of SAs presented robustness in response ($p \leq 0.05$) to the variation of mobile phase flow, acetic acid percentage and column temperature. SMZ and SDM presented robust retention times ($p \leq 0.05$) to the variation of acetic acid percentage and column temperature, with the same ranges applied for these parameters.

The use of CAP-d5 as internal standard did not permit acquisition in MS/MS mode, operating the quadrupole as a mass filter to reduce noise and enhance sensitivity, because CAP and its isotope elute from the chromatographic column at the same time (Figure 2).

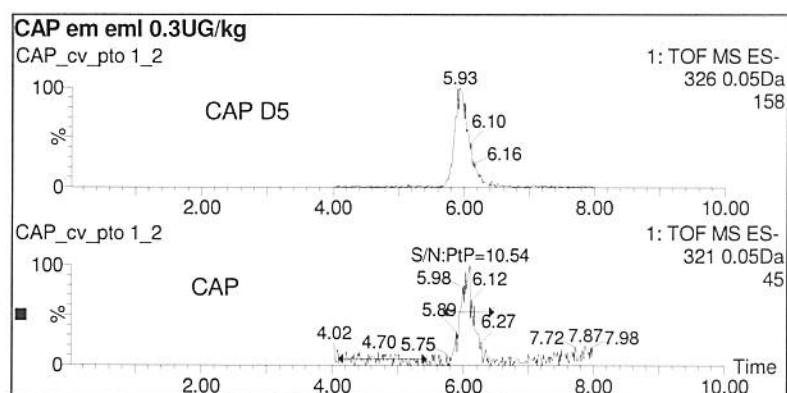


Figure 2. Chromatogram for a honey sample spiked with CAP at $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ and CAP d5 (IS) at $0.6 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Method Validation

For quantification purposes, the most abundant molecular ion of the antimicrobial substances obtained by ESI was considered. The m/z reference ratio for each analyte was calculated by the software (Table 1).

Table 1. The m/z ratios for the most abundant ions calculated by the software based upon chemical formulas.

Analyte	Chemical formula [44]	Molecular Ion	Theoretical m/z
CAP	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	321.0045
STZ	$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	256.0215
SMZ	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	279.0916
SDMX	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	311.0814

After analysis of fortified samples at 5, 10, 15, 20 and $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ with the three SAs, S/N ratios were determined by the software. STZ presented the highest LOD and LOQ,

whereas SMZ and SDM responses surpassed the S/N ratios of 3 and 10 at lower levels of fortification (Table 2). Considering that the LOQs determined for the SAs were much lower than the MRL and that the differences between them were not large, the higher value was considered as calibration curve starting points for all of them. Matrix-matched calibration curves were important to minimize matrix effects and promote good linearity. For SAs, fit weighting $1/x$ was used. The correlation coefficients obtained for the ranges studied were above 0.99, an important result to demonstrate that Q-ToF type equipments can also be used to quantification purposes. Calibration curve parameters, correlation coefficients for the linear regressions (r^2), LOD and LOQ are shown in Table 2.

Table 2. LOD, LOQ and calibration curves parameters for SAs and CAP.

Compound	LOD/LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Slope (mean $\pm$ S.D.; n=3)	Intercept (mean $\pm$ S.D.; n=3)	r^2	Range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
STZ	10/20	0.01012 ± 0.00021	-0.03419 ± 0.0309	0.9929	20 – 300
SMZ	10/15	0.01665 ± 0.000282	-0.05425 ± 0.0407	0.9954	20 – 300
SDMX	5/15	0.00649 ± 0.000089	0.00564 ± 0.0129	0.9970	20 – 300
CAP	-/0.3	0.69590 ± 0.009873	0.04546 ± 0.0135	0.9970	0.3 – 3.0

The method presented satisfactory accuracy in the determination of SAs and CAP at the dynamic ranges studied, considering the results for precision and recovery shown in Table 3.

Table 3. Precision, determined as the mean ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and respective CV (%), and recovery (%) for the quantification of STZ, SMZ, SDM and CAP in fortified honey samples on three different occasions.

Analyte	Spike level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Day 1 (n=5)			Day 2 (n=5)			Day 3 (n=5)			Inter-day (n=15)		
		Mean	CV	Recovery	Mean	CV	Recovery	Mean	CV	Recovery	Mean	CV	Recovery
STZ	50	45	5	90	52	4	105	51	3	97	48	8	97
	100	96	8	96	112	6	112	104	4	104	103	9	104
	150	144	5	96	156	6	104	163	2	109	152	7	102
SMZ	50	50	3	102	51	6	103	51	3	102	51	4	102
	100	104	2	104	107	10	107	107	4	108	106	6	107
	150	152	5	101	158	4	105	166	4	111	158	6	106
SDMX	50	42	9	84	43	8	88	48	4	97	44	9	89
	100	88	5	89	98	12	98	84	18	84	89	11	90
	150	135	7	91	143	6	96	149	4	100	142	7	95
CAP	0,30	0,32	3	108	0,29	13	96	0,29	7	99	0,30	11	99
	0,45	0,42	14	93	0,47	4	105	0,41	17	91	0,44	13	98
	0,60	0,55	18	91	0,61	6	102	0,53	8	88	0,56	13	94

Matrix effects in the suppression or enhancement of the analyte response were not relevant ($\alpha=0.05$) for CAP and STZ. For SMZ and SDMX the mean responses obtained by the standards diluted in the final extract were significantly lower than those for the pure standards. This result reinforces the importance of using matrix matched calibration curves.

Confirmation

According to the criteria from Commission Decision 2002/657/EC, when SIM mode is used for the confirmation of substances listed in Group B of Annex I of Directive 96/23/EC, a minimum of 3 identification points are required. The characteristic product ions obtained by CID of SAs and used for confirmation purposes have been extensively reported [2, 3, 6, 9, 10, 31, 33, 45]. Figure 3 shows the spectra of STZ, SMZ and SDM after CID fragmentation, identifying the precursor ions and respective products for each sulfonamide studied. Therefore, the points obtained for product ion m/z 156.0205 and m/z 108.0509, summed to the ones obtained for each corresponding precursor ion fulfill the criteria for the confirmation of SAs in honey.

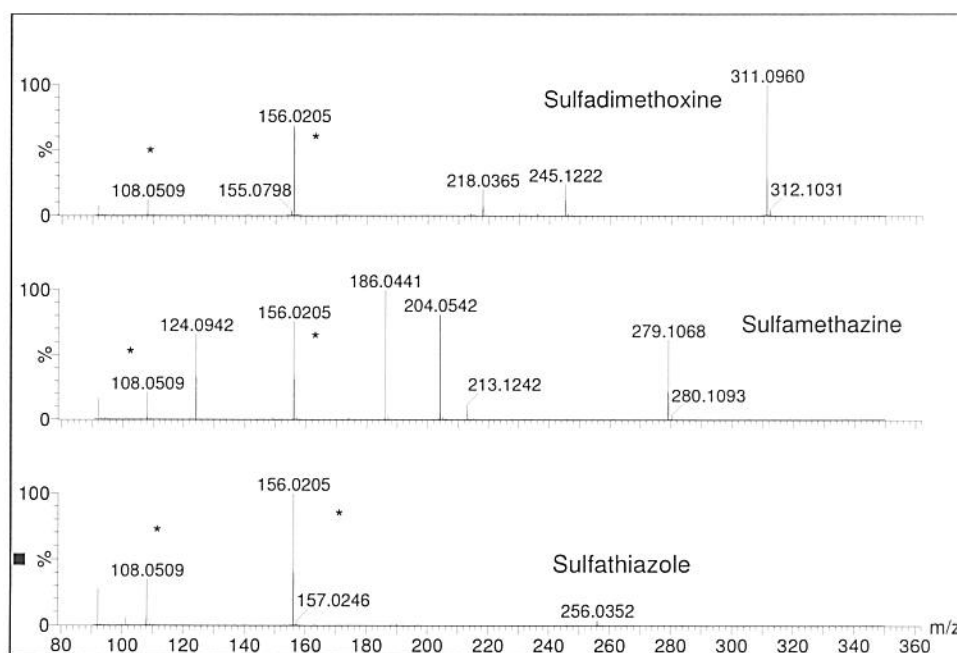


Figure 3. Q-ToF-MS/MS spectra for the three SAs after CID fragmentation showing the precursor and products (*) ions used for confirmation.

The LC-Q-ToF/MS for CAP analysis recorded the full scan spectra during the elution time window programmed. For this condition, Commission Decision 2002/657/EC requires a minimum of four diagnostic ions in the spectrum for the confirmation of unauthorized substances listed in Group A of Annex I of Directive 96/23/EC, including CAP. In Figure 4, the mass spectrum of a honey sample fortified with CAP (c) is compared to its isotope model (a) and to standard solution spectra (b). Four diagnostic ions can be identified in the fortified sample spectrum with relative intensities higher than 10% of the base peak: m/z 321.009, m/z 322.0066, m/z 322.9988 and m/z 325.0041. These ions correspond to the occurrence of the C^{12} , C^{13} , Cl^{35} and Cl^{37} isotopes in the CAP molecules and were present in similar relative intensities to those shown in the isotopic model and CAP standard spectra.

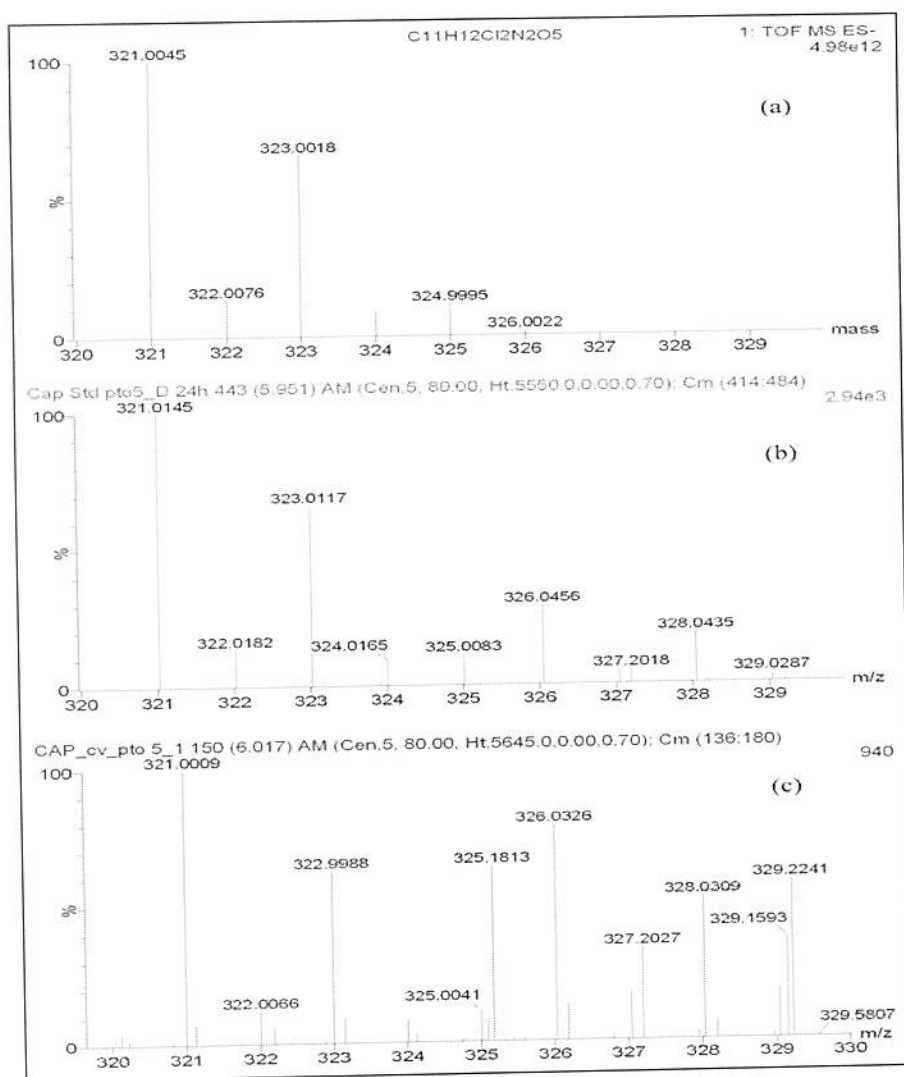


Figure 4. Mass spectra of the theoretical model for CAP (a), CAP standard solution (b) and a fortified honey sample (c).

The capacity of exact mass measurements of Q-ToF became especially important in the differentiation between isobaric species as can be seen in the fortified sample shown in Figure 4 (c). There were other m/z compounds with the same nominal masses as the diagnostic ions. These ions were also detected in some honey samples analyzed and could

interfere in the detection and quantification of the analytes when lower resolution equipment is used.

Confirmation of CAP was also evaluated by MS/MS analysis. The m/z 321 was selected in the quadrupole and submitted to CID fragmentation in the collision cell. The characteristic spectrum with the product ions m/z 257.0243, m/z 194.0422 and m/z 152.0290 is shown in Figure 5.

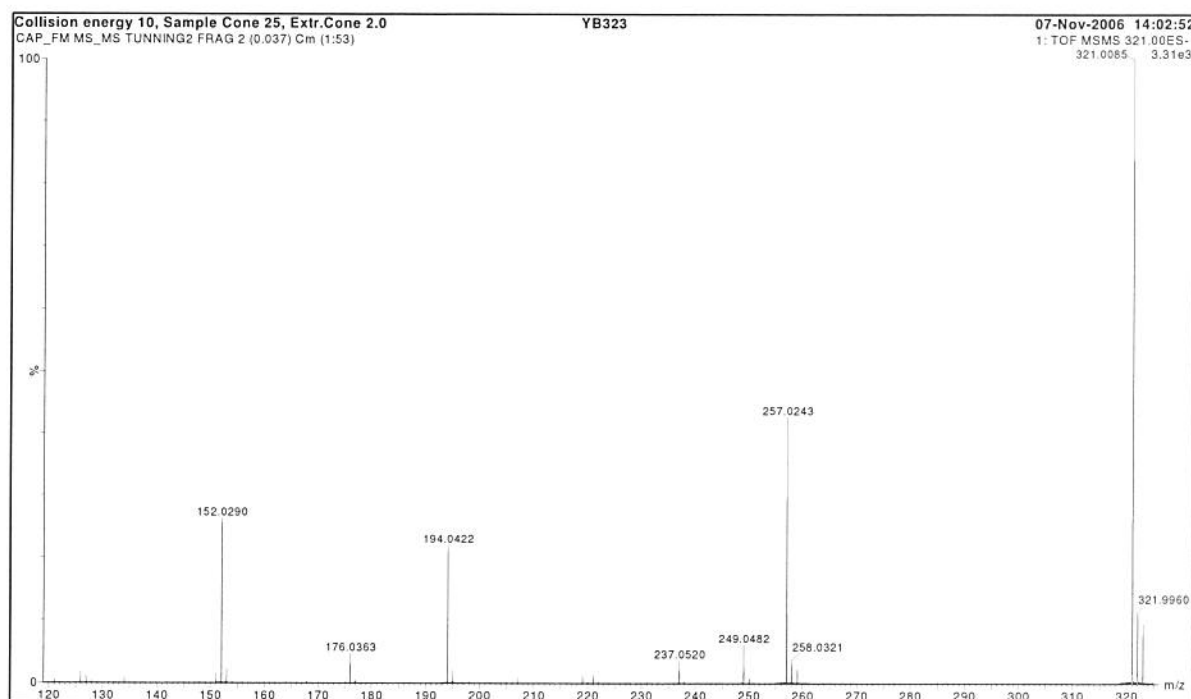


Figure 5: Mass spectrum for CAP standards showing the precursor (m/z 321.0085) and most abundant fragment ions: m/z 257.0243, m/z 194.0422 and m/z 152.0290.

The ability to execute exact mass measurements in the ToF analyzer provided very useful information about the m/z ions generated by ESI in the determination of CAP and SAs in honey. Accurate mass measurements for precursor and products ions could differentiate isobaric species and increase certainty in structure confirmation when

compared to nominal mass determination, especially in complex matrixes. The confirmation could be done in accordance to the performance criteria established in European Commmission Directive 2002/657/EC either by full scan spectra or by SIM with CID fragmentation.

Conclusion

The method developed was capable to detect, quantify and confirm STZ, SMZ, SDM and CAP residues in honey. Even though method sensitivity was lower than that reported for some other LC–MS/MS systems, like QqQ, it is sufficient to determine SAs and CAP at regulatory levels. The performance characteristics evaluated in the validation were satisfactory and prove that a Q-ToF mass spectrometer can be used in quantitative and qualitative analyses, with the advantage of accurate mass measurement for isobaric species differentiation. Despite the need of two injections per sample in order to promote positive and negative ionization modes, the use of a single sample preparation procedure for all these antimicrobials was of great importance to reduce cost and time. However, the possibility of using only one ionization mode in the Q-ToF mass spectrometer for simultaneous determination of CAP and SAs is important and should be further investigated. In a similar way, the possibility to include other sulfonamides and perhaps other antimicrobial families should not be neglected, since the liquid chromatographic system presented efficient chromatographic separation. The development of multi-residue methods are important for the expansion of the surveillance programs and, consequently, to protect consumers and trade.

References

- [1] F. Mutinelli, Pratical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases, *Apiacta* 38 (2003) 149-155.
- [2] A. Kaufmann, S. Roth, B.Ryser, M. Widmer, D. Guggisberg, Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 853-860.
- [3] L. Verzeznassi, M.C. Savoy-Perroud, R.H. Stadler, Application of liquid chromatography-eletrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 77-87.
- [4] L. Verzeznassi, D. Royer, P. Mottier, R.H. Stadler, Analysis of choramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Food. Add. Cont.* 20 (2003) 335-342.
- [5] D. Ortelli, P. Edder, C. Corvi, Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia* 59 (2004) 61-64.
- [6] A. Krivohlavek, Z. Smit, M. Bastinac, I. Juntar, F. Plavsic-Plavsic, The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry method (LC/MS), *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1434-1439.
- [7] K. Vivekanandan, M.G. Swamy, S. Prasad, R. Mukherjee, A simple method of isolation of chloramphenicol in honey and its estimation by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3025-3030.
- [8] D. Quon, Peer validation of a method to confirm chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 586-593.

- [9] R. Sheridan, B. Policastro, S. Thomas, D. Rice, Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3509-3516.
- [10] J. S. Bonvehía, A. L. Gutiérrez, Residues of antibiotics and sulfonamides in honeys from Basque Country (NE Spain), *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 63-72.
- [11] S.E. Jorgensen, B. Halling-Sorensen, Drugs in the environment, *Chemosphere* 40 (2000) 691-699.
- [12] Brazilian Ministry of Agriculture, Instrução Normativa N°10 de 14 de abril de 2008, *DOU* 74 (2008) 29-34.
- [13] European Communities, Commission Decision of 13 March 2003 amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin, 2003/181/EC, *Off. J. Eur. Commun.* (2003) L71/17-L71/18.
- [14] T.G. Diaz, A.G. Cabanillas, F. Salinas, Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography, *Anal. Lett.* 23 (1990) 607-616.
- [15] M. Horie, K. Saito, N. Nose, H. Nakazawa, Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography, *J. AOAC Int.* 75 (1992) 786-789.
- [16] P. Viñas, C.L. Erroz, A.H. Canals, M.H. Cordoba, Liquid chromatography analysis of sulfonamides in foods, *Chromatographia* 40 (1995) 382-386.
- [17] R.D. Caballero, J.R. Torres-Lapasio, J.J. Baeza-Baeza, M.C. Garcia-Alvarez-Coque, Micellar chromatographic procedure with direct injection for the determination of sulfonamides in milk and honey samples, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 24 (2001) 117-131.
- [18] H.Y. Shen, H.L. Jiang, Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 33-41.

- [19] A. Zotou, C. Vasiliadou, Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection, *Chromatographia* 64 (2006) 307–311.
- [20] H. Chen, J. Ying, H. Chen, J. Huang, L. Liao, LC determination of chloramphenicol in honey using dispersive liquid–liquid microextraction, *Chromatographia* 68 (2008) 629–634.
- [21] H. Chen, H. Chen, J. Ying, J. Huang, L. Liao, Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 80–85.
- [22] A. Posyniak, J. Zmudzki, J. Niedzielska, T. Sniegocki, A. Grzebalska, Sulfonamides residues in honey. Control and development of analytical procedure, *Apiacta* 38 (2003) 249–256.
- [23] A.C. Martel, S. Zeggane, HPLC determination of sulfathiazole in French honeys, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26 (2003) 953–961.
- [24] G.F. Pang, Y.Z. Cao, C.L. Fan, J.J. Zhang, X.M. Li, Z.Y. Li, G.Q. Jia, Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 534–541.
- [25] K.E. Maudens, G.F. Zhang, W.E. Lambert, Quantitative analysis of twelve sulfonimides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 85–92.
- [26] V. Hormazabal, M. Yndestad, Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, honey, and urine using liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 24 (2001) 2477–2486.

- [27] S.B. Turnipseed, C. Burns, J. Storey, R. Lee, A. Pfenning, Confirmation of multiple phenicol residues in honey by electrospray LC/MS, *U.S. Food Drug Admin. Lab. Inf. Bull.* 18 (2002) 1-10.
- [28] M.J. Bogusz, H. Hassan, E. Al-Enazi, Z. Ibrahim, M. Al-Tufail, Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry, *J.Chromatogr. B* 807 (2004) 343-356.
- [29] A. Kaufmann, P. Butcher, Quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of chloramphenicol residues in food using sub-2 μ m particulate high-performance liquid chromatography columns for sensitivity and speed, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3694-3700.
- [30] A.F. Forti, G. Campana, A. Simonella, M. Multari, G. Scortichini, Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 257-263.
- [31] G.F. Pang, Y.Z. Cao, J.J. Zhang, G.Q. Jia, C.L. Fan, X.M. Li, Y.M. Liu, Z.Y. Li, Y.Q. Shi, Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1304-1311.
- [32] H.M. Ashwin, S.L. Stead, J.C. Taylor, J.R. Startin, S.F. Richmond, V. Homer, T. Bigwood, M. Sharman, Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 103-108.
- [33] T.S. Thompson, D.K. Noot, Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 168-176.
- [34] H.A.M. Júnior, O. V. Bustillos, M.A.F. Pires, D. T. Lebre, A.Y. Wang, Determination of chloramphenicol residues in industrialized milk and honey samples using LC-MS/MS, *Quim. Nova* 29 (2006) 586-592.

- [35] H.T. Ronning, K. Einarsen, T.N. Asp, Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 226-233.
- [36] J.F. Huang, H.J. Zhang, Y.Q. Feng, Chloramphenicol extraction from honey, milk, and eggs using polymer monolith microextraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry determination, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9279-9286.
- [37] M. Lopez, J. Pettis, I. B. Smith, P. Chu, Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1553-1559.
- [38] Y.A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.H. LeBreton, P.A. Guy, Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 58-76.
- [39] I. Ferrer, J.F. Garcia-Reyes, M. Mezcuca, E.M. Thurman, A.R. Fernandez-Alba, Multi-residue analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 81-90.
- [40] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, LC-MS/MS analysis of organic toxics in food, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 683-703.
- [41] European Communities, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.*, (2002) L221/8-L221/36.
- [42] R. S. Nicolich, E. Werneck-Barroso, M. A. S. Marques, Food safety evaluation: detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 97-102.
- [43] I. Ferrer, E.M. Thurman, Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 750-756.

- [44] Merck & Co. Inc, The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, 12 ed, Merck, Rahway, 1996.
- [45] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 704-732.

CONCLUSÕES GERAIS

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em mel é um problema que envolve produtores, consumidores, comerciantes, exportadores, governos e órgãos de saúde internacionais. Pesquisadores têm contribuído com a divulgação de diferentes técnicas analíticas para determinação dos resíduos de antimicrobianos no mel. Os métodos que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência são, hoje, os mais adequados para esta determinação, devido à capacidade de quantificação e confirmação dos resíduos. Para confirmação, os métodos baseados na espectrometria de massas podem fornecer informações mais confiáveis sobre a estrutura dos compostos detectados como possíveis resíduos.

A metodologia desenvolvida neste trabalho para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina no mel por cromatografia líquida com detector de fluorescência mostrou-se apropriada para este fim. Os materiais e equipamentos utilizados são relativamente simples e de uso freqüente em laboratórios de análise de resíduos. A preparação de amostra é rápida e utiliza pouca quantidade de solventes, diferentemente dos métodos relatados na literatura que utilizam mais de uma etapa de limpeza da amostra. Neste método, a doxiciclina foi utilizada como padrão interno e contribuiu para a precisão dos resultados e linearidade das curvas de calibração. Porém, devido à constante expansão do número de analitos nos programas de monitoramento, a doxiciclina pode ser considerada como resíduo e outro analito deverá ser utilizado como padrão interno.

A pequena quantidade de dados disponíveis na literatura sobre a estabilidade das tetraciclinas, quando estes antimicrobianos estão no mel, dificulta a comparação dos

resultados obtidos. A degradação da tetraciclina nas condições estudadas neste trabalho foi mais rápida do que o relatado por outros autores. Porém, a tetraciclina e a clortetraciclina apresentaram um ritmo de degradação semelhante ao reportado para as soluções padrão destes antimicrobianos armazenados em condições semelhantes. Para a oxitetraciclina, o resultado obtido foi diferente daquele relatado em outro trabalho para a solução padrão desta substância.

Por fim, a metodologia desenvolvida para determinação de sulfonamidas e cloranfenicol por LC-Q-ToF/MS apresentou resultados satisfatórios de desempenho em relação à quantificação dos analitos, uma vez que esta configuração de equipamento é mais utilizada para análises qualitativas e possui uma menor capacidade de fornecer respostas lineares em decorrência, principalmente, das variações de temperatura do ambiente onde está instalado. A impossibilidade de utilização de um mesmo modo de operação do equipamento (positivo ou negativo) para as sulfonamidas e o cloranfenicol prolongou o tempo de análise. Entretanto, o procedimento de preparo da amostra permitiu a obtenção de um único extrato final com todos os analitos. A utilização de um padrão interno deuterado não apresentou vantagem em relação ao utilizado para as sulfonamidas, exceto pelo mesmo motivo citado acima para doxiciclina. A capacidade de determinação da massa do íon molecular com exatidão mostrou o poder de aplicação desta técnica para confirmação da identidade de resíduos de antimicrobianos no mel.

ANEXO I

ARTIGO PUBLICADO NA

Revista Brasileira de Toxicologia 20, n.1 e 2 (2007) 13-19

Medicamentos veterinários e a apicultura: aspectos comerciais, regulatórios e de saúde do consumidor

Gustavo Tayar Peres, Flavia Pereira da Silva Airoidi, Felix Guillermo Reyes Reyes*

*Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade
Estadual de Campinas - UNICAMP*

Abstract

Veterinary drugs on the apiculture: commercial, regulatory and consumer health aspects

Apiculture is subject to attacks by plagues, which impair productivity of the apiary and, consequently, the revenue of the producer. To control these diseases veterinarian management techniques and the application of veterinary drugs such as oxytetracycline, chloramphenicol, streptomycin and sulfathiazole are employed. Nevertheless, residues of these antimicrobial agents can be present in honey, exposing the consumer to health risks in consequence of their ingestion. The aim of this work is to discuss the consequences of the use of veterinary drugs in the apiculture, considering the aspects related to consumers health, regulation and international trade of honey.

Keywords: veterinary drugs, apiculture, honey, antimicrobials, residues.

ANEXO II

**Artigo publicado na
Revista Brasileira de Toxicologia 20, n.1 e 2 (2007) 21-28**

Medicamentos veterinários na apicultura: metodologias analíticas para determinação de resíduos no mel

Gustavo Tayar Peres, Flavia Pereira da Silva Airoidi, Felix Guillermo Reyes Reyes*

Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Abstract

Veterinary drugs on the apiculture: analytical methodologies for residues determination

There is an increasing demand for the determination of veterinary drug residues in honey. To determine these residues, many analytical techniques are available, but the high performance liquid chromatography has an important position, since it can be connected to different detectors in order to reach the required selectivity for the contaminant identification and quantification. Nowadays, mass spectrometry has become one of the most appropriated techniques to determinate veterinary drug residues in foods. However, the sample preparation is still a critical step in this kind of analysis. The present work is a review of the analytical methods that use high performance liquid chromatography for the determination of veterinary drug residues in honey, with emphasis on mass spectrometry and sample preparation.

Keywords: chromatography, residues, antimicrobial, veterinary drugs, honey, mass spectrometry.
