



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



**Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos
para a Determinação de Resíduos de Estreptomicina e
Diidroestreptomicina em Leite Bovino
(ELISA, LC-APCI-MS/MS QToF)**

Renata Cabrera de Oliveira

Farmacêutica-Bioquímica

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos.

Campinas - SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

OL4d Oliveira, Renata Cabrera de
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite (ELISA, LC-APCI-MS/MS QToF / Renata Cabrera de Oliveira -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Contaminantes. 2. Medicamentos veterinários. 3. Estreptomicina. 4. Diidroestreptomicina. I. Reyes Reyes, Felix Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Development and validation of analytical methods for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk (ELISA, LC-APCI-MS/MS QToF)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Contaminants, Veterinary drug residues, Streptomycin, Dihydrostreptomycin

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos
Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes
Miguel Machinski Junior
Juliana Azevedo Lima Pallone
Vera Lúcia Ferracini
Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Data da defesa: 31/07/2009
Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(Presidente)

.....
Prof. Dr. Miguel Machinski Junior
(Membro)

.....
Prof. Dra. Vera Lúcia Ferracini
(Membro)

.....
Prof. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
(Suplente)

.....
Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal
(Suplente)

Campinas-SP

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, em memória, à D. Elena,
minha sogra, que certamente também estaria
muito feliz neste momento.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por realizar em mim os sonhos dEle.

Ao Prof. Felix, pela valiosa orientação, amizade e ensinamentos.

À minha mãe, Eliane, por sempre ter me apoiado em todos os meus desejos e por ter me ensinado a querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

Especialmente aos meus irmãos, Fernanda, Ana Luiza e Henrique por encherem minha vida de amor e felicidade.

Ao Otávio, por ter ajudado minha mãe na nossa formação pessoal e profissional. Ao meu pai e à Dirce.

Ao meu Vô Chico, que sempre foi um exemplo de sabedoria e dignidade.

Aos meus tios Denise e Telinho e ao Caio, por terem me acolhido com muito carinho e pelo exemplo em todos os aspectos.

A todos os outros membros da minha família tão grande e amada.

Ao meu grande amor, Thiago, pelo apoio, incentivo e pela alegria e tranquilidade que trouxe a minha vida, e à sua família que me recebeu com muito carinho.

À Gi e às companheiras de república, Pati, Dani Gaúcha, Dani Bio e Natália, pela amizade e pelos deliciosos momentos que temos vivido juntas.

Aos meus amigos que moram longe que eu amo muito.

Aos amigos do laboratório de Toxicologia de Alimentos da UNICAMP. Camila, Flávia, Gustavo, Hellen, Jonas, Ju Hashimoto, Ju Teles, Marcela, Mazé, Raquel, Renata, Sabrina e à Sílvia, por tudo que aprendi com vocês, pelos cafezinhos e cervejinhas e, principalmente, por me suportarem todos os dias. De maneira especial, àqueles que me apoiaram durante a realização deste trabalho, ajudando com os equipamentos, amostras, correção do texto ou simplesmente com o carinho... Indispensável! Vocês sabem como são valiosos para mim.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões.

Novamente, ao Prof. Miguel, membro da banca examinadora, à Érika, e ao pessoal do laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, por terem me incentivado a fazer este curso e por tudo que me ensinaram.

À Keila, do Instituto de Zootecnia, SP, e à Sueli, do CCI, UNICAMP, por todo apoio com os testes de ELISA.

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

À FAPESP pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

Muito Obrigada

Renata

*Não te desamparem a benignidade e a fidelidade;
ata-as ao teu pescoço; escreve-as na tábua do teu coração.
E acharás graça e bom entendimento
aos olhos de Deus e do homem.
(Pv 3:3-4)*

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO I. Aspectos Toxicológicos e Analíticos de Resíduos de Aminoglicosídeos em Leite Bovino.

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Produção de Leite Bovino.....	8
Composição do Leite.....	10
Mastite.....	12
Resíduos de Antimicrobianos no Leite.....	15
Aspectos Toxicológicos dos Aminoglicosídeos.....	16
Métodos Analíticos para Determinação de Aminoglicosídeos.....	18
Considerações Finais.....	25
Referências Bibliográficas.....	26

CAPÍTULO II. Development and Validation of a LC-APCI-MS/MS QToF Analytical Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk

Abstract.....	35
Introduction.....	36
Material and Methods.....	37
Results and Discussion.....	42
Conclusions.....	50
References.....	51

CAPÍTULO III. Ocorrência de Resíduos de Estreptomicina e Diidroestreptomicina em Leite Pasteurizado Comercializado na Região de Campinas, SP

Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	59
Resultados e Discussão.....	67
Conclusões.....	71
Referências Bibliográficas.....	73
 CONCLUSÃO GERAL.....	 76
 ANEXO.....	 78

TABELAS

CAPÍTULO I. Aspectos Toxicológicos e Analíticos de Resíduos de Aminoglicosídeos em Leite Bovino.

Tabela 1. Classificação mundial dos principais países produtores de leite bovino em 2007.....	9
Tabela 2. Balanço comercial do setor lácteo no Brasil no ano de 2007.....	10
Tabela 3. Características bioquímicas das proteínas do leite.....	11

CAPÍTULO II. Development and Validation of a LC-APCI-MS/MS QToF Analytical Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk

Table I. Elution Gradient for the chromatographic analysis of STP and DHSTP.	40
Table II. Matrix effects for STP and DHSTP, obtained using ESI and APCI ionization for spiked milk samples.....	46
Table III. Accuracy and precision results obtained in the intra and inter day assays.	48

CAPÍTULO III. Ocorrência de Resíduos de Estreptomicina e Diidroestreptomicina em Leite Pasteurizado Comercializado na Região de Campinas, SP.

Tabela 1. Gradiente de eluição para análise de STP e DHSTP.....	64
Tabela 2. Valores de erro médio relativo (% R.E.) entre os níveis de concentração das soluções padrão e os valores previstos pelo modelo.....	67
Tabela 3. Resultados de exatidão e precisão obtidos nos ensaios de repetibilidade intra e inter-dias para STP e DHSTP em leite por ELISA.....	68

FIGURAS

CAPÍTULO I. Aspectos Toxicológicos e Analíticos de Resíduos de Aminoglicosídeos em Leite Bovino.

- Figura 1. Composição de medicamentos antimicrobianos disponíveis no mercado brasileiro para tratamento de mastite por via intramamária. Dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos. Dados do Manual de Produtos Veterinários. SINDAN 2003-2004..... 14
- Figura 2. Composição de medicamentos antimicrobianos disponíveis no mercado brasileiro para tratamento de mastite por via sistêmica. Dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos. Dados do Manual de Produtos Veterinários. SINDAN 2003-2004..... 14
- Figura 3. Estrutura química dos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina, gentamicina, neomicina..... 17

CAPÍTULO II. Development and Validation of a LC-APCI-MS/MS QToF Analytical Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk

- Figure 1. STP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (b) in standard solution extracted mass chromatograms. ESI ionization..... 43
- Figure 2. STP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (b) in standard solution extracted mass chromatograms. APCI ionization..... 43
- Figure 3. (a) Isotopic profile of the suppressing interfering ion ($m/z = 365$), obtained from the LC-ESI-MS/MS analysis of a blank milk sample after the extraction procedure, and (b) the isotope model of the lactose sodium adduct ion, simulated by *Masslynx*[®]..... 44
- Figure 4. Spiked milk sample chromatograms - STP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (b). ESI ionization..... 45
- Figure 5. Spiked milk sample chromatograms - STP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (b). APCI ionization..... 45
- Figure 6. STP (a) and DHSTP (b) fragmentation spectra, obtained using LC-APCI-MS/MS QToF..... 46

Figure 7. Analytical curve for STP. Dynamic range: 50 to 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Correlation coefficient (r) = 0.99.....	47
Figure 8. Analytical curve for DHSTP. Dynamic range: 50 to 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Correlation coefficient (r) = 0.99.....	47
Figure 9. Extracted mass chromatograms of milk samples spiked with TOB 2.5 mg kg^{-1} , STP 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and DHSTP 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$: m/z ratios of 490.1 (a), 582.3 (b) and 584.3 (c), respectively.....	49
Figure 10. Extracted mass chromatograms of blank samples: m/z ratios of 490.1 (a), 582.3 (b) and 584.3 (c).....	49

CAPÍTULO III. Ocorrência de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite pasteurizado comercializado na região de Campinas, SP.

Figura 1. Mapa da região de Campinas, com destaque para as cidades em que foram coletadas as amostras. Fonte: Guia Geográfico.....	60
Figura 2. Distribuição das amostras em relação aos bairros de Campinas em que foram adquiridas.....	60
Figura 3. Curva analítica preparada em solução padrão para cálculo da concentração dos resíduos de STP e DHSTP em leite. $r=0,9995..$	70

RESUMO GERAL

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em níveis acima dos limites máximos (LMR) estabelecidos apresentam riscos à saúde humana. O conhecimento da dimensão da exposição da população a esses compostos é necessário para garantir a proteção do consumidor. Para tanto, é imprescindível que métodos de análise validados estejam disponíveis, para assegurar a confiabilidade dos resultados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite e empregá-los na análise de amostras comercializadas na região de Campinas, São Paulo. Os métodos analíticos desenvolvidos e validados incluem o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS QToF). A validação analítica foi realizada de acordo com as recomendações da Comunidade Européia e IUPAC. Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, curva analítica, linearidade, sensibilidade, precisão (repetibilidade intra e inter-dias), exatidão e limites de detecção e de quantificação. Os resultados do procedimento de validação dos métodos de ELISA e LC-MS/MS demonstraram que estes são adequados para a análise de triagem e confirmatória, respectivamente, de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite pasteurizado, em níveis de concentração inferiores ao LMR estabelecido para essas substâncias ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nas amostras analisadas não foram encontrados resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em níveis detectáveis.

SUMMARY

Veterinary drugs pose a risk to human health when their residual levels in foods exceed the maximum residue limit (MRL). Knowledge of the extent of human exposure to these compounds is necessary to provide consumer protection. To achieve this, it is essential that validated analytical methods are available to ensure reliable results. The aim of the present work was to develop and validate analytical methods for the analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, and to employ these methods for analysis of samples marketed in the region of Campinas, São Paulo. The developed and/or validated methods include enzyme immunoassay (ELISA) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS QToF). Method validation was performed according to the recommendations established by European Community and IUPAC. The following parameters were evaluated: analytical curve, linearity, sensitivity, precision (intra and inter-day repeatability), accuracy and the detection and quantification limits. The results demonstrated the effectiveness of ELISA and LC-MS/MS methods for trial and confirmatory analyses, respectively, of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk at concentrations below the established MRL (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). In the analyzed samples streptomycin and dihydrostreptomycin were not found at detectable levels.

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento dos riscos à saúde humana, atribuído ao emprego de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, pode estar associada aos resíduos dos mesmos em níveis acima dos limites máximos recomendados (LMR).

Os antimicrobianos, compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, são administrados na medicina veterinária, principalmente na prevenção ou tratamento de infecções, para manutenção da produção de alimentos e competição no mercado interno e externo. No entanto, o uso dessas substâncias em animais pode levar à presença de resíduos no alimento destinado ao consumo humano, que constitui riscos à saúde do consumidor, como reações tóxicas, hipersensibilidade e desenvolvimento de resistência bacteriana em microrganismos patogênicos ao homem (FAO/OIE/WHO, 2003).

O conhecimento da dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para direcionar as ações de controle visando a proteção do consumidor (BRITO, 2006). Para tanto, é imprescindível que estejam disponíveis informações sobre níveis de resíduos de medicamentos em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano, além de métodos de análise validados, para assegurar a confiabilidade dos resultados.

No Brasil, foi criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), instituído pela Portaria 51, de 06 de maio de 1986 (BRASIL, 1986), e alterado pela Portaria 527, de 15 de agosto de 1995 (BRASIL, 1995). Esse plano prevê a adoção de Programas Setoriais para Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP. Primeiramente, foi implantada a avaliação em produtos cárneos bovinos. No ano de 2006, a ação do plano foi estendida para o controle de resíduos em carne (bovina, suína, aves e equina), leite, mel, ovos e pescado.

No ano de 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), que prevê o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano (ANVISA, 2003). Entre os antimicrobianos incluídos no PAMVet e no PNCR, se destacam os aminoglicosídeos, como a estreptomicina, diidroestreptomicina, gentamicina e neomicina, que é uma das classes mais utilizadas no tratamento de infecções como mastites e enterites (SHAIKH e ALEEN, 1985; WOODWARD e SHEARER, 1995).

Este trabalho pretende contribuir, através do desenvolvimento de métodos analíticos e análise de amostras, com o PNCR e o PAMVet na área de controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, sendo que os resultados obtidos poderão auxiliar as agências de vigilância sanitária a avaliar o risco à saúde humana decorrente da exposição a resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina presentes no leite.

Referências Bibliográficas

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet, Brasília, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Portaria Nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2631>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. 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. Portaria Nº 527, de 15 de agosto de 1995. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16313>. Acesso em 1 de setembro de 2008.

- BRITO, M.A.V.P. Resíduos de antimicrobianos no leite: um problema que tem solução. Juiz de Fora, julho de 2006. Disponível em <http://www.cnpqi.embrapa.br/jornaleite/artigo.php?id=20>. Acesso em 04 de abril de 2007.
- FAO/OIE/WHO. Joint of FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>> Acesso em: 15 de maio de 2009.
- SHAIKH, B., ALLEN, E. H. Overview of Physical-Chemical Methods for Determining Aminoglycoside Antibiotics in Tissues and Fluids of Food-Producing Animals. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v.68, n.5, p.1007-1013, 1985.
- WOODWARD, K.N., SHEARER, G. Antibiotic use in animal production in the European Union – Regulations and current method for residue detection. In: OKA, H., NAKAZAWA, H., HARADA, K.I., MACNEIL, J.D. Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture. Arlington: AOAC International, 1995, cap.3.

CAPÍTULO I

Aspectos Toxicológicos e Analíticos de Resíduos de Aminoglicosídeos em Leite Bovino.

Aspectos Toxicológicos e Analíticos de Resíduos de Aminoglicosídeos em Leite Bovino.

Resumo

Os antimicrobianos são utilizados como medicamentos veterinários na bovinocultura de leite, principalmente na prevenção ou tratamento da mastite. A administração incorreta dos antimicrobianos ou a desconsideração do período de carência após o fim do tratamento pode resultar na presença de resíduos acima dos limites máximos (LMR) estabelecidos para essas substâncias no leite. Os aminoglicosídeos são antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento da mastite. No entanto, a presença de resíduos de aminoglicosídeos no leite, acima do LMR estabelecido, representa risco à saúde dos consumidores devido à capacidade dessas substâncias de induzir nefrotoxicidade e ototoxicidade, assim como reações alérgicas em pessoas sensíveis, além de propiciar resistência bacteriana. O conhecimento da dimensão da exposição da população a esses compostos é necessário para garantir a proteção do consumidor. Para tanto, é imprescindível que métodos de análise validados estejam disponíveis, para assegurar a confiabilidade dos resultados. Para análise de triagem de resíduos de aminoglicosídeos em leite, se destacam os métodos imunoenzimáticos, como ELISA. Para análise confirmatória, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) tem se mostrado o método mais adequado, com procedimentos simples de preparo de amostras e baixos limites de detecção.

Abstract

Antimicrobial agents are useful as dairy cattle veterinary drugs, mainly for the prevention and treatment of mastitis. The incorrect administration or the non-observation of the withdrawal period after treatment may result in residues above the maximum limits (MRLs) established for these substances in milk. Aminoglycosides are antimicrobial widely used for the treatment of mastitis. However, the presence of aminoglycosides residues, above the MRLs established in milk, poses human health risks due to ototoxicity and nephrotoxicity induction and allergic reactions, in addition to bacterial resistance. Knowledge of the extent of human exposure to these compounds is necessary to provide effective consumer protection. To achieve this, it is essential that validated analytical methods are available to ensure reliable results. Immunoassays, such as ELISA, are commonly used for monitoring the presence of aminoglycosides residues in milk. For confirmatory analysis, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been the most reliable method, requiring simple sample treatment procedures and providing low detection limits.

Introdução

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza e apresenta composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais, principalmente cálcio. Amplamente usado na alimentação humana, o leite é produzido e comercializado em todo o mundo. Segundo os dados mais recentes, em 2007, a produção mundial de leite bovino foi igual a 560 milhões de toneladas. Dentre os principais produtores se destacam os Estados Unidos da América, Índia, China, Federação Russa, Alemanha, Brasil, França e Nova Zelândia, responsáveis por metade da produção mundial. No mesmo ano, o Brasil movimentou aproximadamente US\$ 450 milhões com a exportação e importação de leite bovino, equivalente a mais de 160 mil toneladas de leite (EMBRAPA, 2008).

Os antimicrobianos, compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, são administrados na medicina veterinária, principalmente na prevenção ou tratamento de infecções. No entanto, o uso dessas substâncias em animais pode levar à presença de resíduos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no alimento destinado ao consumo humano, que constitui riscos à saúde do consumidor, como reações tóxicas, hipersensibilidade e desenvolvimento de resistência bacteriana em microrganismos patogênicos ao homem (FAO/OIE/WHO, 2003).

A ocorrência de resíduos de medicamentos nos alimentos ocorre, principalmente, após administração incorreta do produto, decorrente do não cumprimento das Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, como a não observação das especificações de uso de cada medicamento, como via de administração, dose, períodos de tratamento e de carência.

Para garantir a qualidade dos alimentos, o *Codex Alimentarius* definiu níveis de tolerância quanto à presença desses resíduos em alimentos, denominados Limites Máximos de Resíduos (LMR). Diante disso, produtores, veterinários e agências reguladoras e inspetoras de saúde pública devem estar cientes da necessidade de se garantir a segurança dos alimentos.

O controle dos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos tem como objetivo a garantia da inocuidade alimentar e a segurança do consumidor, sendo também indispensável em países que buscam a competitividade no mercado internacional (MARTINS JUNIOR et al, 2006).

Para esse controle, as agências de fiscalização devem dispor de métodos de análise que apresentem resultados confiáveis, devidamente validados, com adequada detectabilidade e seletividade. Para tanto, procedimentos de preparo de amostras a serem empregados devem permitir uma análise com precisão e exatidão satisfatórias (GIBBONS-BURGENER et al, 2000).

No Brasil, foram criados o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR (BRASIL, 1986, BRASIL, 1995), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que prevê a adoção de programas setoriais para carne, mel, leite e pescado; e o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com o objetivo de controlar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano (ANVISA, 2003).

Entre os antimicrobianos incluídos no PAMVet e o PNCR, se destacam os aminoglicosídeos, como a estreptomicina, diidroestreptomicina, gentamicina e neomicina, por comporem uma das classes mais utilizadas no tratamento de infecções como mastites e enterites (SHAIKH e ALEEN, 1985; WOODWARD e SHEARER, 1995). Esses programas incluem, ainda, a inspeção da presença de resíduos de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, anfenicóis e sulfonamidas em leite.

Produção de leite bovino

De acordo com os dados mais recentes, o Brasil foi o sexto maior produtor mundial de leite em 2007, tendo produzido mais de 25 milhões de toneladas

(EMBRAPA, 2008), o equivalente a 4,5% da produção mundial, conforme pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação mundial dos principais países produtores de leite bovino em 2007.

Países	Produção de Leite (milhões t) 2007	Percentual	
		Total	Acumulado
1º Estados Unidos da América	84,189	15,02	15,02
2º Índia	42,140	7,52	22,54
3º China	32,820	5,86	28,39
4º Federação Russa	31,950	5,70	34,09
5º Alemanha	27,900	4,98	39,07
6º Brasil	25,327	4,52	43,59
7º França	23,705	4,23	47,82
8º Nova Zelândia	15,842	2,83	50,65
9º Reino Unido	14,450	2,58	53,22
10º Ucrânia	12,300	2,19	55,42
11º Polônia	11,800	2,11	57,52
12º Itália	11,000	1,96	59,49
13º Turquia	11,000	1,96	61,45
14º Paquistão	11,000	1,96	63,41
15º Holanda	10,750	1,92	65,33
16º Argentina	10,500	1,87	67,20
17º Austrália	10,350	1,85	69,05
18º México	9,599	1,71	70,76
19º Japão	8,140	1,45	72,22
20º Canadá	8,000	1,43	73,64
Outros	147,725	26,36	100,00
TOTAL	560,487	100	

Fonte: FAO

Elaboração: R.Zoccal - Embrapa Gado de Leite

Atualização: dezembro/2008

Em dezembro de 2007, o comércio do setor lácteo brasileiro apresentou rendimento de US\$ 35,9 milhões. Durante esse ano, as exportações somaram US\$ 298,8 milhões, equivalentes a 103,5 mil toneladas de leite. As importações totalizaram US\$ 151,5 milhões, que equivalem a uma quantidade importada de 64,2 mil toneladas (FORTES e FONSECA, 2008) (Tabela 2).

Tabela 2. Balanço comercial do setor lácteo no Brasil no ano de 2007.

Mês	2007					
	Valor (US\$ milhões)			Volume (mil toneladas)		
	Exportação	Importação	Saldo Mês	Exportação	Importação	Saldo Mês
JANEIRO	13,2	17,0	-3,8	7,1	9,0	-1,9
FEVEREIRO	14,7	14,6	0,1	7,0	7,5	-0,5
MARÇO	16,4	10,9	5,5	7,7	6,3	1,5
ABRIL	15,3	9,8	5,5	7,0	4,5	2,5
MAIO	19,3	9,4	9,9	7,7	4,6	3,1
JUNHO	12,5	7,3	5,2	4,9	3,1	1,8
JULHO	16,2	13,2	2,9	5,7	5,4	0,3
AGOSTO	27,2	11,1	16,1	9,0	4,4	4,6
SETEMBRO	17,4	14,7	2,7	5,5	4,6	0,9
OUTUBRO	39,0	21,5	17,5	12,3	7,3	4,9
NOVEMBRO	60,5	10,7	49,8	15,4	3,9	11,2
DEZEMBRO	47,0	11,1	35,9	14,6	3,7	10,9
Acumulado	298,8	151,5	147,4	103,5	64,2	39,3

Fonte: Embrapa Gado de Leite (2008).

As exportações brasileiras no primeiro semestre de 2008 totalizaram 226,8 milhões de litros em contraste com a importação de 97,8 milhões. Os principais clientes do leite brasileiro estão no continente africano e na América Latina.

Estima-se que o Brasil tenha faturado cerca de US\$ 550 milhões com a exportação de leite e derivados durante o ano de 2008, equivalentes a aproximadamente 1 bilhão de litros, destinados à mais de cem países. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (2008), a confirmação desses resultados consolidará o país entre os grandes exportadores mundiais de produtos lácteos, ao lado de Nova Zelândia, Austrália e países da União Européia.

Composição do leite

O leite secretado por vacas sadias apresenta conteúdo constante de lactose, potássio e sódio. Durante a lactação ou na ocorrência de mastite, podem aparecer concentrações mais altas de sódio e cloretos no leite, devido ao extravasamento de líquido dos vasos sanguíneos, decorrente do aumento na permeabilidade celular (GONZÁLEZ, 2001).

A lactose, que é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e outra de galactose, é o principal carboidrato encontrado no leite de todas as espécies de mamíferos, apresentando uma concentração variável entre 4,6 e 5,2% no leite bovino. Esse açúcar, que apresenta importante função na síntese do leite, é responsável pela transferência de água para o leite, sendo seu principal componente osmótico (BRITO et al, 2007).

As principais proteínas do leite bovino são a caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, soroalbumina e imunoglobulinas (Tabela 3). A caseína, a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina correspondem a 95% das proteínas do leite, sendo sintetizadas no úbere, a partir de peptídeos, proteínas e aminoácidos do plasma sanguíneo. A soroalbumina, as imunoglobulinas e a γ -caseína são transferidas do sangue para o leite.

Tabela 3. Características bioquímicas das proteínas do leite.

Proteínas	Proporção (%) do total de proteínas	Ponto isoelétrico	Massa Molecular (u)
α -Caseína	45-55	4,1	23.000
κ -Caseína	8-15	4,1	19.000
β -Caseína	25-35	4,5	24.000
γ -Caseína	3-7	5,8-6,0	
α -Lactoglobulina	2-5	5,1	14.437
β -Lactoglobulina	7-12	5,3	18.000
Soroalbumina	0,7-1,3	4,7	68.000
Lactoferrina	0,2-0,8	--	87.000
Imunoglobulinas			
IgG1	1-2	--	160.000
IgG2	0,2-0,5	--	160.000
IgM	0,1-0,2	--	~1.000.000
IgA	0,05-0,10	--	~4000.000

Fonte: GONZÁLEZ, 2001

A gordura é um dos componentes mais abundantes do leite bovino e de concentração e composição variáveis, principalmente devido à influência da nutrição, diferenças entre raças e variações de acordo com o estágio de lactação. Os triacilglicerídeos compõem aproximadamente 98% do total da gordura do leite. Os outros 2% são compostos por diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, glicolipídeos e ácidos graxos livres.

Os mais importantes minerais secretados no leite, sob o ponto de vista nutritivo, são o cálcio e o fósforo. O cálcio e o magnésio se encontram física ou quimicamente ligados com caseína, citrato ou fosfato, permitindo o acúmulo de concentração elevada de cálcio no leite, que mantém o equilíbrio osmótico com o sangue.

A capacidade tamponante do leite se deve ao conteúdo de citrato, fosfato, bicarbonato e proteínas, sendo que a ação conjunta dos sistemas tampão formados, mantém constante a atividade hidrogeniônica do leite, resultando em pH próximo de 6,6 (GONZÁLEZ, 2001).

Mastite

A mastite é reconhecida no mundo como a maior causa de perda econômica na criação de gado leiteiro devido à diminuição da produção e qualidade do leite. Estima-se que 70% das perdas econômicas por esta doença são causadas pela diminuição da produção de leite, 14% pela retirada prematura do animal da produção, 7% pelo descarte do leite e 8% pelas despesas com veterinário e tratamento (NUÑES et al, 2001).

Essa doença, que é a inflamação da glândula mamária da vaca, é causada, principalmente, por agentes infecciosos como bactérias, vírus e fungos ou por traumas provocados por agentes químicos, físicos, mecânicos, térmicos ou, ainda, por problemas metabólicos. Devido ao seu difícil controle e erradicação, é a doença infecciosa que mais afeta o gado leiteiro em todo o mundo.

De acordo com os sintomas, a mastite pode ser classificada em clínica e subclínica. Na mastite clínica, o animal apresenta sinais visíveis na glândula mamária, como edema, vermelhidão e dor local. Ocorrem, ainda, alterações na viscosidade do leite e surgimento de coágulos, pus e sangue. Na mastite subclínica, embora não haja alterações visíveis na glândula mamária, ocorrem prejuízos significativos na qualidade e na quantidade de leite produzido pelo animal (COSTA et al, 1995).

Em presença de um microorganismo patogênico na glândula mamária, o organismo do animal reage, enviando células de defesa para o local, principalmente leucócitos, com o objetivo de reverter o processo infeccioso. Essas células e as células de descamação do epitélio secretor são chamadas células somáticas (PEDERSEN et al, 2003).

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é o principal método utilizado no diagnóstico da mastite. Existem vários testes que avaliam a quantidade de células somáticas no leite, e entre estes se destacam o CMT (*California Mastitis Test*), o WMT (*Wisconsin Mastitis Test*) e a contagem eletrônica de células somáticas (RUPP et al, 2000).

A mastite é classificada como recorrente quando o animal apresenta mais de três casos de mastite clínica durante uma lactação, cinco casos durante sua vida útil, ou quando apresenta CCS acima de 500 mil durante cinco meses consecutivos (MERIAL, 2005).

A inflamação da glândula mamária reduz a síntese de gordura, caseína e lactose, e o teor médio de cálcio e potássio, além de aumentar a transferência das seroproteínas, albuminas, sódio e cloro do sangue para o leite. A redução da caseína no leite é compensada pelo aumento na quantidade de proteínas provenientes do sangue, tornando mínima a alteração na quantidade de proteína total (GONZÁLEZ, 2001).

O tratamento da mastite, na sua forma clínica ou subclínica, baseia-se no uso de antimicrobianos, por via sistêmica ou intramamária. No Brasil, entre os antimicrobianos de uso intramamário registrados para o tratamento da mastite, se destacam os aminoglicosídeos (28,6%) e β -lactâmicos (35,7%), assim como a associação das duas classes (10,7%) ou de amiglicosídeos com outras classes de antimicrobianos (10,7%) (Figura 1).

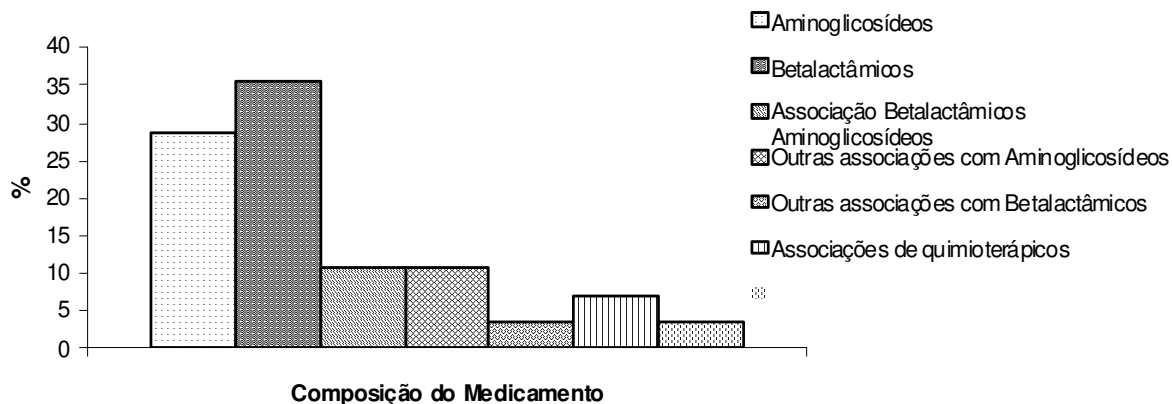


Figura 1. Composição de medicamentos antimicrobianos disponíveis no mercado brasileiro para tratamento de mastite por via intramamária. Dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos. Dados do Manual de Produtos Veterinários. (SINDAN, 2003-2004).

Entre os antimicrobianos de uso sistêmico, a associação entre aminoglicosídeos e β -lactâmicos (31,9%) e os antimicrobianos da classe das tetraciclina (25,8%) são os mais utilizados (Figura 2).

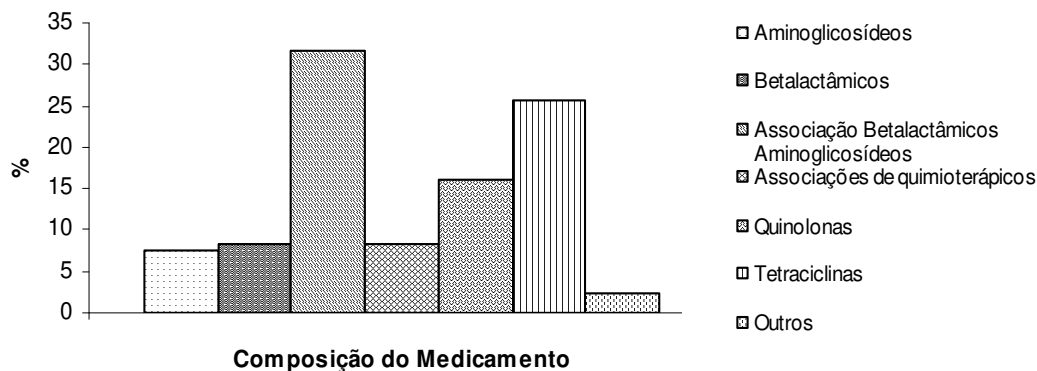


Figura 2. Composição de medicamentos antimicrobianos disponíveis no mercado brasileiro para tratamento de mastite por via sistêmica. Dados apresentados em porcentagem dos principais grupos farmacológicos. Dados do Manual de Produtos Veterinários. (SINDAN, 2003-2004).

Frequentemente, o tratamento de um animal que tenha apresentado mastite crônica é economicamente inviável, sendo mais vantajoso o seu sacrifício (SANTOS, 2007). Até o momento, não se dispõe de estimativa de prejuízos econômicos causados pela mastite no Brasil, entretanto, alguns estudos apontam

alta prevalência da doença (COSTA et al, 1995; PARDO et al, 1998; COSTA et al, 1999a).

Resíduos de Antimicrobianos no Leite

Os antimicrobianos são administrados na medicina veterinária, principalmente para prevenção ou tratamento de infecções mamárias, como a mastite (HILLERTON et al, 1999). O descumprimento das boas práticas veterinárias de uso dessas substâncias pode resultar na presença de resíduos no leite.

A mastite provoca o aumento da permeabilidade das membranas existentes entre o sangue e o tecido glandular, o que resulta em maior transferência de compostos presentes no sangue para a glândula mamária. Por esse motivo, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite tem sido atribuída, principalmente, ao tratamento da mastite clínica, tanto por via intramamária quanto sistêmica.

A administração de antimicrobianos sistêmicos em animais com outras doenças infecciosas também pode ocasionar a presença de resíduos no leite. Entretanto, mesmo a administração de doses elevadas do medicamento resultaria em baixos níveis dos antimicrobianos na glândula mamária, muito inferiores aos que podem ocorrer no tratamento da mastite (COSTA et al, 1999a).

A ocorrência dos resíduos de medicamentos veterinários em níveis superiores aos limites máximos recomendados (LMR) em alimentos de origem animal destinados ao consumo pode ser atribuída ao não respeito das Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, principalmente, no que diz respeito às especificações de uso indicadas para cada medicamento, como via de administração, dose e período de tratamento, além do período de carência, que é recomendado para que o alimento obtido do animal medicado possa ser consumido sem comprometer a saúde da população (COSTA et al, 1999b; COSTA et al, 2000).

A presença desses resíduos no leite constitui riscos à saúde do consumidor, como reações tóxicas, hipersensibilidade e resistência bacteriana (ALANIS, 2005), além de afetar a produção de derivados do leite devido à inibição de culturas lácteas utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos, ou ainda por causar problemas na acidificação e textura de queijos e promover a formação de odores desfavoráveis na manteiga e no creme de leite, causando prejuízos econômicos (COSTA et al, 1999a; STEAD et al, 2008).

Aspectos Toxicológicos dos Aminoglicosídeos

No Brasil, os aminoglicosídeos estão entre os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções como mastites e enterites (BOGIALLI et al, 2005), sendo encontrados em diversas formulações farmacêuticas comerciais como único princípio ativo ou associado com penicilina G ou outros β -lactâmicos (Figuras 1 e 2) (WHITTEN e HANLOM, 1997). No entanto, o uso clínico desses antimicrobianos é limitado por seus efeitos adversos como a nefrotoxicidade e a ototoxicidade (LONG e ROYBAL, 1994).

A nefrotoxicidade induzida pelos aminoglicosídeos se manifesta clinicamente como uma falência renal não oligúrica, ou seja, sem diminuição da produção urinária, com discreto aumento da creatinina plasmática. A toxicidade é decorrente do acúmulo de uma pequena, mas considerável, proporção da dose administrada nas células epiteliais dos túbulos proximais, causando alterações morfológicas e funcionais no córtex renal com severidade progressiva de acordo com a dose e o tempo de tratamento (MINGEOT-LECLERCQ e TULKENS, 1999).

O acúmulo de aminoglicosídeos nas células sensoriais vestibulares na cóclea do ouvido interno causa progressiva perda auditiva e disfunção vestibular. A ototoxicidade está diretamente relacionada com o período de tratamento e com os medicamentos utilizados, variando entre 10 e 20% nos tratamentos de curta duração, até 80% em pacientes que recebem terapia crônica para tuberculose.

Esses efeitos são cumulativos após múltiplos tratamentos com aminoglicosídeos e, ao invés da nefrotoxicidade, são irreversíveis (MACHADO et al, 2007).

Todos os aminoglicosídeos contêm aminoaçúcares ligados a um anel aminociclitol por ligações glicosídicas (CHAMBERS, 2001) e os mais utilizados como agentes terapêuticos são gentamicina, neomicina, estreptomicina e diidroestreptomicina, cujas estruturas são apresentadas na Figura 3 (PRESCOTT, 2000).

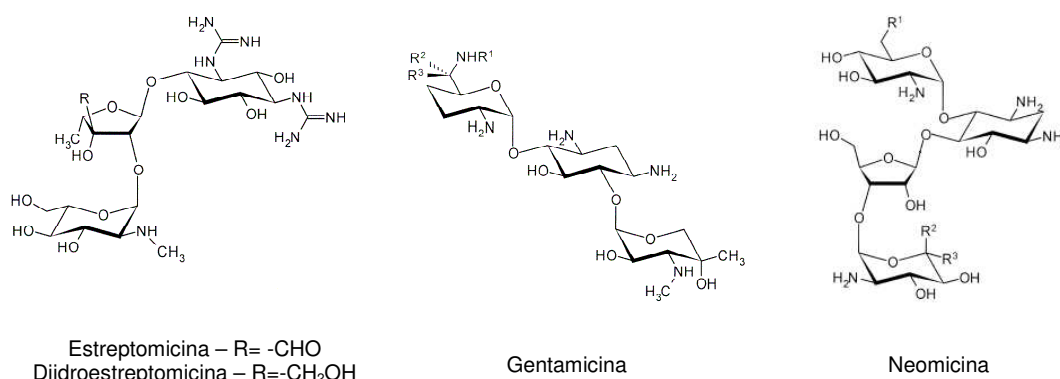


Figura 3. Estrutura química dos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina, gentamicina, neomicina.

Em relação ao mecanismo de ação, os aminoglicosídeos se ligam à subunidade 30S do ribossomo, diminuindo a síntese protéica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, causando alteração na função da membrana celular com saída de constituintes essenciais, provocando a morte celular (OLIVEIRA et al, 2006). Essa classe apresenta efeito pós-antibiótico, em que, devido à forte e irreversível ligação ao ribossomo, mesmo após a diminuição dos níveis séricos, o antimicrobiano permanece intracelularmente, inibindo a divisão celular, permitindo um longo intervalo entre as doses administradas (SAMANIDOU e EVAGGELOPOULOU, 2007).

Apesar da eficácia terapêutica comprovada, alguns aminoglicosídeos podem determinar persistência de resíduos em animais tratados (ERSKINE et al, 1992; WHITTEN e HANLON, 1997).

O Codex Alimentarius e a Comunidade Européia (CE) estabeleceram os limites máximos de resíduos (LMR) para gentamicina, neomicina e a soma de estreptomicina e diidroestreptomicina no leite em $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (CE, 1990; Codex Alimentarius, 2006). A Resolução GMC nº 54/2000 do MERCOSUL (2000) estabeleceu o mesmo valor de LMR para estreptomicina mais diidroestreptomicina, enquanto para neomicina o LMR foi definido em $500 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para gentamicina, o MERCOSUL não estabeleceu limite máximo de resíduos.

A presença desses resíduos no leite, acima do LMR, representa risco à saúde dos consumidores devido à toxicidade potencial e ao possível surgimento de reações alérgicas em pessoas sensíveis, além de propiciar o desenvolvimento de resistência bacteriana, já relatada na literatura (BACCARO et al, 2002, RIBEIRO et al, 2006, STELLA et al, 2008). As alergias aos aminoglicosídeos são raras, porém, ocorrem ocasionalmente, podendo resultar em erupções cutâneas urticariformes (COSTA et al, 1999a).

Métodos Analíticos para Determinação de Aminoglicosídeos

Para a determinação de aminoglicosídeos no leite são utilizados métodos de triagem e métodos confirmatórios. Os métodos de triagem têm capacidade para analisar um número elevado de amostras simultaneamente e são utilizados para selecionar, em um grande número de amostras, quais apresentam resultados potencialmente não conformes. Os métodos confirmatórios são aqueles que fornecem informações completas ou complementares aos testes de triagem para a identificação inequívoca de uma substância e, quando necessário, a sua quantificação ao nível requerido (CE, 2002).

Os métodos microbiológicos, em que a presença de antimicrobianos na amostras é determinada pela inibição do crescimento microbiano em um meio de cultura, podem ser utilizados para triagem por apresentarem baixo custo e por fornecerem resultados quanto à presença de diferentes classes de

antimicrobianos. Entretanto, não apresentam detectabilidade e precisão adequadas. Além disso, apresentam seletividade comprometida, devido à possível ocorrência de reações cruzadas decorrentes da alta concentração de células somáticas e são métodos com longo tempo de procedimento, que não fornecem resultados em menos de seis horas (SCHENCK e CALLERY, 1998).

Os métodos imunoenzimáticos, como ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), são baseados no princípio de interação imuno específica entre antígeno e anticorpo. Devido à rapidez de obtenção dos resultados, esses métodos de triagem têm sido muito utilizados para a detecção de contaminantes em alimentos. Os métodos de ELISA apresentam boa detectabilidade e simplicidade, além da possibilidade de análise simultânea de muitas amostras, e utilização de pequenos volumes de amostras, uma vez que imunoenaios, geralmente não necessitam de procedimentos de extração e pré-concentração (HAASNOOT et al, 1999; ABUKNESHA e LUK, 2005; JIN et al, 2006).

Diversos ensaios imunoenzimáticos foram descritos para triagem de aminoglicosídeos em leite com limites de detecção abaixo de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para gentamicina, neomicina e estreptomicina (HAASNOOT et al, 1999; ABUKNESHA e LUK, 2005; JIN et al, 2006; WANG et al, 2009). O preparo das amostras geralmente é realizado por centrifugação em baixa temperatura para separação da gordura e diluição do leite. Os métodos possuem alta seletividade em relação aos outros aminoglicosídeos, exceto os que se destinam à determinação de estreptomicina, que apresentam aproximadamente 75% de reação cruzada para diidroestreptomicina. Embora a reação cruzada seja um inconveniente em termos de seletividade, nesse caso, a possibilidade de utilização do mesmo kit para a análise de estreptomicina e diidroestreptomicina torna a reação cruzada um parâmetro interessante para análise de triagem. As recuperações relatadas variaram entre 75 e 108%.

Devido às reações cruzadas com componentes da amostra, os testes de ELISA são geralmente suscetíveis a resultados falso positivo, sendo necessário

um método mais seletivo para confirmação, como os métodos cromatográficos associados à espectrometria de massas.

Os métodos cromatográficos associados a diferentes sistemas de detecção são muito empregados nas análises para determinação de aminoglicosídeos em leite.

Poucos métodos foram desenvolvidos para a análise de aminoglicosídeos por cromatografia gasosa (CG), por serem compostos não voláteis e demandarem longos e complexos processos de derivatização química a elevadas temperaturas, para serem analisados por essa técnica. Clark et al (1993) utilizaram cromatografia gasosa para a determinação de gentamicina e neomicina em leite. O preparo de amostras foi realizado por extração ácida e limpeza em coluna trocadora de cátions. A derivatização foi realizada em duas etapas, utilizando N-trimetilsililimidazol (TMSI) para sililação dos grupos hidroxila e N-heptafluorobutirilimidazol (HFBI) para acilação dos grupos amina, e seguida de análise por captura de elétrons.

A separação dos aminoglicosídeos por cromatografia líquida associada à detecção por espectrometria na região do ultravioleta (UV) e do visível (Vis) é comprometida pela ausência de grupos cromóforos e fluoróforos nesses analitos, tornando necessária uma etapa de derivatização química. Para permitir essa análise, a derivatização pós-coluna é preferível em relação às reações pré-coluna, porém ambos os procedimentos constituem complicações no procedimento analítico e são demorados. Além disso, os aminoglicosídeos não podem ser derivatizados com o mesmo reagente devido à diferença estrutural entre as moléculas, que podem possuir aminas primárias ou grupos guanidino, o que dificulta uma análise de multirresíduos. Geralmente, o o-ftaldialdeído (OPA) é utilizado para derivatização de aminas primárias, como gentamicina, kanamicina e neomicina, e a β -naftoquinona-4-sulfonato (NQS) para compostos guanidino, como a estreptomicina e a diidroestreptomicina (YORKE et al, 2000). Ainda, devido à alta polaridade dos aminoglicosídeos, é necessário o uso de par iônico para promover a retenção desses compostos quando se faz uso de fase

estacionária reversa, tanto em cartuchos de extração em fase sólida como em colunas analíticas.

O leite possui altas concentrações de proteínas, gorduras e carboidratos, que podem variar de acordo com a espécie do qual foi obtido, com a dieta e o número de dias decorridos a partir do início da lactação, entre outros fatores. Essas variáveis podem interferir na separação cromatográfica, afetando a capacidade quantitativa do método (ROSSI e WRIGHT, 1997). Para tanto, o preparo de amostras é uma etapa essencial que tem o objetivo de extrair e, quando necessário, concentrar o analito, separando as proteínas e outros componentes que possam interferir na análise e diminuir a detectabilidade do método (STEAD, 2000).

McGrane et al (2000) obtiveram recuperações médias entre 65 e 99%, 88 e 109% e 74 e 90% e limites de quantificação iguais a 62,5, 100 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para neomicina, kanamicina e gentamicina, respectivamente, em amostras de leite utilizando detecção por fluorescência subsequente à derivatização pós-coluna com OPA na presença de mercaptoetanol. O preparo de amostras foi realizado por extração em fase sólida com cartucho trocador catiônico fraco, constituído de adsorvente contendo grupo carboxílico. Fennell et al (1995) obtiveram menores limites de detecção, iguais a 0,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para gentamicina em leite e carne, respectivamente, e recuperações superiores a 90%, demonstrando que a reação de derivatização com OPA na presença de ácido mercaptoacético e detecção por UV fornece melhores resultados em relação ao mercaptoetanol, utilizado para detecção por fluorescência. O uso de cartucho de SPE bifuncional, constituído de fase reversa (C_{18}) e fase trocadora catiônica fraca (COO^-) contribuiu para os resultados, permitindo a obtenção de extratos limpos e cromatogramas sem a presença de interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos.

Para a determinação de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite por cromatografia líquida, foram desenvolvidos diversos métodos analíticos utilizando derivatização pós-coluna com NQS em meio alcalino e preparo de amostras por desproteinização ácida e extração em fase sólida, obtendo-se limites de

quantificação entre 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (GERHARDT et al, 1994; EDDER et al, 1999; ABBASI e HELLENÄS, 1998; SUHREN e KNAPPSTEIN, 1998). No entanto, a separação cromatográfica adequada de estreptomicina e diidroestreptomicina, maior desafio na análise desses compostos, devido à sua grande similaridade estrutural, foi apresentada somente por Viñas et al (2007), que utilizaram coluna analítica Discovery RP-Amide C₁₆ (150 x 4,6 mm) e uma mistura de acetonitrila e ácido heptanossulfônico (HSA) como fase móvel. Os autores obtiveram limites de quantificação iguais a 9 e 19 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para estreptomicina e diidroestreptomicina, respectivamente, empregando um método simples de preparo de amostras, por desproteinização com ácido perclórico e filtração.

A espectrometria de massas possibilita a confirmação de identidade do composto de interesse a partir dos dados de massa molecular do íon precursor e seus produtos de fragmentação, que fornecem informações sobre a estrutura da molécula. Além da possibilidade de confirmação, o recurso de cromatograma de massa selecionada pode solucionar problemas na determinação quantitativa de compostos que não apresentem boa resolução na separação cromatográfica.

Os espectrômetros de massas disponíveis são muito variados, principalmente quanto ao tipo de analisador de massas empregado. A seleção do equipamento de interesse em uma análise é determinada, entre outros fatores, pela sensibilidade e seletividade requeridas e o objetivo geral do trabalho. As análises podem ser realizadas em analisadores de massas isolados (MS), como o quadrupolo (Q), ou em equipamentos que possuem combinações de analisadores, denominados espectrômetros de massas em *tandem* (MS/MS). A espectrometria de massas em *tandem* é um processo no qual os íons formados na fonte de ionização são analisados em dois estágios. No primeiro estágio, os íons são selecionados através de suas razões massa/carga e atravessam uma cela de colisão, na qual podem ser fragmentados. No segundo estágio, os produtos formados são analisados (GLISH e BURINSKY, 2008).

O tipo e a qualidade dos dados obtidos por espectrometria de massas podem variar de acordo com o tipo de analisador utilizado nos dois estágios de

análise e com o tipo de reação que ocorre entre esses analisadores. Os equipamentos do tipo triplo quadrupolo (QqQ) são os mais amplamente utilizados para análises de rotina de medicamentos veterinários em alimentos (CHERLET et al, 2003; ANDERSEN et al, 2005; TOUSSAINT et al, 2005; POZO et al, 2006; RUBIES et al, 2006). Esse tipo de configuração apresenta vantagens características, como alta sensibilidade e seletividade. Entretanto, são limitados em relação à elucidação estrutural dos analitos (LACORTE e FERNANDEZ-ALBA, 2006). Os espectrômetros de massas híbridos são combinações de dois analisadores diferentes para obtenção de melhores características de desempenho. Os analisadores do tipo QToF, que utilizam um quadrupolo (Q) associado a um analisador por tempo de voo (ToF), são exemplos de analisadores híbridos e oferecem vantagens, como alta resolução e espectro de massas, o qual fornece informações mais específicas sobre a estrutura de um composto. Embora, esse analisador possa apresentar problemas como baixa detectabilidade e falta de linearidade (HOGENBOOM et al, 2001), alguns trabalhos descritos na literatura, citados a seguir, demonstram que é possível realizar a quantificação de resíduos de aminoglicosídeos em leite empregando analisadores do tipo QToF, com obtenção de bons resultados.

Em relação ao preparo de amostras, a análise por espectrometria de massas geralmente requer um procedimento pouco complexo, como foi descrito por Bruijnsvoort et al (2004), que desenvolveram um método simples com excelentes resultados para análise de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS), com ionização por eletrospray (ESI) e analisador triplo quadrupolo (QqQ). Para separação foi utilizada coluna analítica Alltima C₁₈ (150 x 2,1 mm i.d., 5 µm) e ácido pentafluoropropiônico (PFPA):acetonitrila como fase móvel. A extração foi simples, utilizando ácido sulfossalicílico e centrifugação. Foram obtidas recuperações entre 99% e 102%, e limites de quantificação iguais a 10 µg kg⁻¹ e 5 µg kg⁻¹ para estreptomicina e diidroestreptomicina, respectivamente.

Heller et al (2005) desenvolveram um método para análise de neomicina e gentamicina em leite por LC-ESI-MS/MS QqQ. Nesse método de análise, foi obtido limite de quantificação igual a $4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando procedimento de preparo de amostras por remoção da gordura, desproteinização com ácido tricloroacético e pré-concentração do extrato.

Lu e Feng (2006) estabeleceram um método para a análise de traços de neomicina e para a triagem dos aminoglicosídeos amikacina, gentamicina, kanamicina, e tobramicina em amostras de leite por LC-ESI-MS/MS QToF. Para tanto, utilizaram um método de extração e limpeza mais complexo, envolvendo micro-extração em fase sólida, em coluna capilar de sílica fundida com fase reversa C_{18} , utilizando ácido heptafluorobutírico (HFBA) como par iônico. Os aminoglicosídeos foram analisados diretamente sem evaporação e reconstituição do extrato. O limite de quantificação foi de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Ghidini et al (2007) obtiveram limites de detecção entre 14 e $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para estreptomicina, diidroestreptomicina, kanamicina, apramicina, neomicina e gentamicina em leite, realizando desproteinização com ácido tricloroacético, seguida de centrifugação e análise cromatográfica em coluna analítica Discovery C_8 (125 x 4,6 mm, 5 μm). A fase móvel, constituída de ácido fórmico e HFBA, foi eluída de acordo com um gradiente. A análise foi realizada por LC-ESI-MS/MS QqQ. Oliveira et al (2009) obtiveram limite de quantificação igual a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando preparo de amostras semelhante. No entanto, utilizaram pela primeira vez a ionização química a pressão atmosférica (APCI) associada a analisador do tipo QToF para análise de aminoglicosídeos em leite. Na separação cromatográfica foi utilizada coluna C_{18} X-Terra[®] MS (150 x 2,1 mm, 5 μm) e fase móvel constituída por um gradiente de solução aquosa e orgânica de HFBA. As recuperações variaram entre 84 e 110%.

A eletroforese capilar (EC) tem sido utilizada como uma importante técnica de separação devido ao seu alto poder de resolução, pequena quantidade necessária de amostra e curto tempo de análise. No entanto, a análise de aminoglicosídeos por essa técnica apresenta as mesmas limitações em relação à

detecção, mencionadas para a análise por cromatografia líquida associada à espectrometria UV/Vis, sendo necessárias etapas de derivatização para análise por UV ou fluorescência. A derivatização pré-capilar (FONGE et al, 2004; KAALE et al, 2005) ou no capilar (KAALE et al, 2001; KAALE et al, 2003) com OPA e detecção por UV foram descritas. Recentemente, um método utilizando cromatografia micelar eletrocínética acoplada a fluorescência induzida por laser (LIF) foi desenvolvido por Serrano e Silva (2006) para a análise de aminoglicosídeos em leite após derivatização com sulfoindocianina succinimidil éster (Cy5). Foram obtidos excelentes resultados com preparo de amostras realizado por SPE, com limites de detecção entre 3,0 e 6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para amikacina, kanamicina, neomicina e paromomicina.

Considerações Finais

O uso de antimicrobianos na medicina veterinária pode levar a presença de resíduos desses medicamentos no leite bovino, apresentando riscos à saúde humana. Os aminoglicosídeos são antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento da mastite e, quando presentes em níveis residuais nos alimentos, como o leite, podem representar riscos à saúde dos consumidores, como ototoxicidade e nefrotoxicidade, além de reações alérgicas e desenvolvimento de resistência bacteriana.

Para avaliar a presença de resíduos de aminoglicosídeos em leite são necessários disponíveis métodos analíticos de triagem ou confirmatórios que apresentam adequado desempenho. Para triagem, os ensaios imunoenzimáticos, como ELISA, são apropriados, e têm sido utilizados por fornecerem resultados rápidos e confiáveis, necessitando de poucas e simples etapas de preparo de amostra, o que representa grande vantagem na rotina laboratorial. Os métodos confirmatórios, como a técnica de espectrometria de massas, são fundamentais para a garantia dos resultados em análises de resíduos, apresentam alta seletividade e baixos limites de detecção.

Referências Bibliográficas

- ABBASI, H., HELLENÄS, K.E. Modified determination of dihydrostreptomycin in kidney, muscle and milk by HPLC. *Analyst*, v.123, p.2725, 1998.
- ABUKNESHA, R.A., LUK, C. Enzyme immunoassays for the analysis of streptomycin in milk, serum and water: development and assessment of a polyclonal antiserum and assay procedures using novel streptomycin derivatives. *Analyst*, v.130, p.964–970, 2005.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, v.36, p.697–705, 2005.
- ANDERSEN, W.C., ROYBAL, J.E., GONZALES, S.A., TURNIPSEED, S.B., PFENNING, A.P., KUCK, L.R. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.529, n.1-2, p.145-150, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet, Brasília, Novembro de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- BACCARO, M.R., MORENO, A.M., CORRÊA, A., FERREIRA, A.J.P., CALDERARO, F.F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.2, p.15-18, 2002.
- BOGIALI, S., CURINI, R., DI CORCIA, A., LAGANÀ, A., MELE, M., NAZZARI, M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1067, p.93-100, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Portaria Nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2631>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. 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. Portaria Nº 527, de 15 de agosto de 1995. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16313>>. Acesso em 1 de setembro de 2008.

- BRITO, M.A., BRITO, J.R., ARCURI, E., LANGE, C., SILVA, M., SOUZA, G. Composição do Leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_217_20039243.html>. Acesso em 22 de Junho de 2009.
- BRUIJNSVOORT, M. Van, OTTIK, S.J.M., KLAAS, M.J., BOER, E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1058, p.137-142, 2004.
- CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos: Os Aminoglicosídeos. In: GILMAN, A. G., HARDMAN, J.G., LIMBIRD L.E. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica 10ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2001, cap.46, p.913-928.
- CHERLET, M., SCHELKENS, M., CROUBELS, S., BACKER, P.D. Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.492, n.1-2, p.199-213, 2003.
- CLARK, S.B., HURLBUT, J.A., GEISLER, C.A. Poster Presentation at the 107th AOAC International Meeting, 26–29 July and LC analysis with fluorescence detection. 1993. Washington, DC, p. 347.
- CODEx ALIMENTARIUS. Veterinary Drug Residues in Food Maximum Residue Limits. 2006. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/VetDrugServlet?Substances=323&Items=501&Tissues=9&out_style=by+substance&Domain=VetDrugMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fvetdrugs%2Fvetd_q-e.htm>. Acesso em 22 de Julho de 2009.
- COMUNIDADE EUROPÉIA - COMISSION REGULATION (EEC) 2377/90 Official Journal of European Community. L224, n.1, 1990.
- COMUNIDADE EUROPÉIA - Decisão da Comissão 657/2002. Jornal Oficial da Comunidade Européia L221/8, 2002.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Exportação de leite cresce e amplia lucro do produtor. 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=677>>. Acesso em 15 de maio de 2009.
- COSTA, E.O., MELVILLE; P.A., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., WHITE, C.R., PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, p.215-217, 1995.
- COSTA, E.O., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., SILVA, J.A.B., GARINO JÚNIOR, F., BENITES, N.R., HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. *Napgama*, v.2, p.16-20, 1999a.

- COSTA, E.O., RAIA, R.B., GARINO JR., F., WATANABE, E.T., RIBEIRO, A.R., GROFF, M.R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. *Revista Napgama*, v.2, n.1, p.10-13, 1999b.
- COSTA, E.O., RAIA, R., WATANABE, E.T., GARINO JR., F., COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite dos quartos sadios não tratados. *Revista Napgama*, v.3, n.4, p.14-17, 2000.
- EDDER, P., COMINOLI, A., CORVI, C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post column derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, v.830, p.345-351, 1999.
- EMBRAPA GADO DE LEITE. Classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca – 2007. Atualização em 2008. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/>. Acesso em 3 de junho de 2009.
- ERSKINE, R.J., WILSON, R.C., RIDDELL, M.G. JR., TYLER, J.W., SPEARS, H.J., DAVIS, B.S. In tramammary administration of gentamicin as treatment for experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, n.3, p.375-381, 1992.
- FAO/OIE/WHO. Joint of FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>>. Acesso em: 15 de maio de 2009.
- FENNELL, M.A., CORNELIUS, E.U., RAYMOND, W.S., SOMA, L.R., Gentamicin in tissue and whole milk: an improved method for extraction and cleanup of samples for quantitation on HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.1849-1852, 1995.
- FONGE, H., KAALE, E., GOVAERTS, C., DESMET, K., SCHEPDAEL, A.V., HOOGMARTENS, J. Bioanalysis of tobramycin for therapeutic drug monitoring by solid-phase extraction and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v.810, n.2, p.313-318, 2004.
- FORTES, L.R.L.S. e FONSECA, L. Balança comercial do setor lácteo. Panorama do Leite on line. Embrapa gado de leite. Ano 2, n.15, 2008. Disponível em <http://www.cnpgl.embrapa.br/panorama/produtos15.html>. Acesso em 01 de setembro de 2008.
- GERHARDT, G.C., SALISBURY, C.D.C., MacNEIL, J.D., Analysis of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v.77, n.3, p.765-767, 1994
- GIBBONS-BURGENER, S.N., KANEENE, J.B., LLOYD, J.W., ERSKINE, R.J. Influence of the milk and dairy beef quality assurance program on dairy farm

- drug management practices. Journal of the American Veterinary Medical Association, v.26, n.12, p.1960-1964, 2000.
- GHIDINI, S., ZANARDI, E., CONTER, M., VARISCO, G., BOLZONI, G., IANIERI, A. Residues of Aminoglycosides in milk: Confirmatory Analysis. Veterinary Research Communications, v.31, p.365-367, 2007.
- GLISH, G.L., BURINSKY, D.J. Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry Journal of the American Society for Mass Spectrometry, v.19, p.161, 2008.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F.H.D., DÜRR, J.W., FONTANELI, R.S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001, p. 5-22.
- HAASNOOT, W., STOUTEN, P., GAZEMIER, G., LOMMEN, A., NOUWS, J.F.M., KEUKENS, H.J. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney. Analyst, v.124, p. 301-305, 1999.
- HELLER, D.N., PEGGINS J.O., NOCHETTO, C.B., SMITH, M.L., CHIESA, O.A., MOULTON, K. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. Journal of Chromatography B, v.821, p.22-30, 2005.
- HILLERTON, J. E., HALLEY, B. I., NEAVES, P. Detection of antimicrobial substances in individual cow and quarter milk samples using Delvotests microbial inhibitor tests. Journal of Dairy Science, v.82, p.704–711, 1999.
- HOGENBOOM, A.C., NIESSEN, W.M.A., BRINKMAN, U.A.Th. The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis. Determination and identification of pesticides in water. Journal of Separation Science, v.24, n.5, p.331 – 354, 2001.
- JIN, Y., JANG, J.W., LEE, M.H., HAN, C.H. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. Clinica Chimica Acta, v.364, n.1-2, p.260 – 266, 2006.
- KAALE, E., GOIDSENHOVEN, E.V., SCHEPDAEL, A.V., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. Electrophoretically mediated microanalysis of gentamicin with in-capillary derivatization and UV detection. Electrophoresis, v.22, n.13, p.2746-2754, 2001.
- KAALE, E., SCHEPDAEL, A.V., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. Determination of kanamycin by electrophoretically mediated microanalysis with in-capillary derivatization and UV detection. Electrophoresis, v.24, n.6, p.1119-1125, 2003.
- KAALE, E., LONG, Y., FONGE, H.A., GOVAERTS, C., DESMET, K., SCHEPDAEL, A.V., HOOGMARTENS, J. Gentamicin assay in human serum by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. Electrophoresis, v.26, n. 3, p.640-647, 2005.

- LACORTE, S., FERNANDEZ-ALBA, A.R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews*, v.25, p.866, 2006.
- LONG, A.R., ROYBAL, J.E. Drug residues in food of animal origin. In: HUI, Y.H., GORHAN, J.R., MURREL, K.D., CLIVER, D.O. *Foodborne disease handbook*. New York: Marcel Dekker, 1994. v.3. p.529-554.
- LU, C.Y., FENG, C.H. On-line concentration of neomycin and screening aminoglycosides in milk by short capillary column and tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v.29, n.14, p.2143-2148, 2006.
- MACHADO, B., CARDOSO, R., PEREIRA, R. Aminoglicosídeos. 2007. Disponível em http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g60_aminoglicosideos/toxicid.html Acesso em 18 de maio de 2009.
- MARTINS JÚNIOR, H.A., BUSTILLOS, O.V., PIRES, M.A.F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “*tandem*” (LC-MS/MS). *Química Nova*, v.29, n.3, p.586-592, 2006.
- MCGRANE, M., KEUKENS, H. J., O’KEEFFE, M., VAN RHIJN, J. A., SMYTH, M.R. A fully validated assay for the analysis of aminoglycoside antibiotics in milk and kidney. 2000. Disponível em http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Contributions%20I-Z/McGrane%20758-764.pdf Acesso em 22 de abril de 2009.
- MERCOSUL – MERCADO COMUM DO CONE SUL. Metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Resolução 54/2000, [s.n.l.], 2000.
- MERIAL. Manual Técnico Mastite, 2005. Disponível em: <http://br.merial.com/pecuaristas/doencas/mastite/mastite.asp>. Acesso em 01 de setembro de 2008.
- MINGEOT-LECLERCQ, M-P., TULKENS, P.M. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.5, p. 1003-1012, 1999.
- NUÑES, B.S.M., CAÑON, H., IRAGÜEN, D., ESPINOSA, S., LILLO, J. Depletion study of trimethoprim and sulphadiazine in milk and its relationship with mastitis pathogenic bacteria strains minimum inhibitory concentrations (MICs) in dairy cows. 001. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.24, p.83-88, 2001.
- OLIVEIRA, J.F.P., CIPULLO, J.P., BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, v.21, n.4, p.444-452, 2006.
- OLIVEIRA, R.C., PASCHOAL, J.A.R., SISMOTTO, M., AIROLDI, F.P., REYES, F.G.R. Development and Validation of an LC-APCI-MS/MS QToF Analytical

- Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk. *Journal of Chromatographic Science*, 2009. *In press*.
- PARDO, P.E, METTIFOGO, E., MÜLLER, E.E., NASCIMENTO, E.R., BUZINHANI, M., YAMAGUTI, M., FREITAS, J.C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18 n.3-4, 1998.
- PEDERSEN L.H., AALBAEK B., RONTVED C.M., INGVARTSEN K.L., SORENSEN N.S., HEEGAARD P.M. & JENSEN H.E. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *Journal of Comparative Pathology*. v.128, p.156-164, 2003.
- POZO, O.J., GUERRERO, C., SANCHÓ, J.V., IBÁÑEZ, M., PITARCH, E., HOGENDOORN, E., HERNÁNDEZ, F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1103, n. 1, p.83-93, 2006.
- PRESCOTT, J.F. Aminoglycosides and aminocyclitols. In: PRESCOTT, J.F., BAGGOT, J.D., WALKER, R.D. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* 3ª Ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 2000. p.191-228.
- RIBEIRO, A.R., KELLERMANN, A., SANTOS, L.R., FITTÉL, A.P., NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.3, p.357-360, 2006.
- ROSSI, D.T., WRIGHT, D.S. Analytical considerations for trace determinations of drugs in breast milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.15, n.4, p. 495-504, 1997.
- RUBIES, A., VAQUERIZO, R., CENTRICH, F., COMPAÑÓ, R., GRANADOS, M., PRAT, M.D. Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection. *Talanta*. v.72, n.1, p.269-276, 2006.
- RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 46, p. 99-111. 2000.
- SAMANIDOU, V.F., EVAGGELOPOULOU, E.N. Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *Journal of Separation Science*, v.30, p.2549 - 2569, 2007.
- SANTOS, M. V. Perdas de produção leiteira causadas pela mastite clínica. 2007. Disponível em: www.milk.point.com.br. Acesso em 26 de agosto de 2008.
- SCHENCK, F.J., CALERRY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, v.812, p.99-109, 1998.

- SERRANO, J.M., SILVA, M. Trace analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine milk by MEKC with LIF detection. *Electrophoresis*, v.27, n.23, p.4703-4710, 2006.
- SHAIKH, B., ALLEN, E. H. Overview of Physical-Chemical Methods for Determining Aminoglycoside Antibiotics in Tissues and Fluids of Food-Producing Animals. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.68, n.5, p.1007-1013, 1985.
- SINDAN. Manual de Produtos Veterinários – MPV Veículo Oficial do SINDAN, 4ª ed., São Paulo, Robe ed., 2003-2004. 1106p.
- STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.747, n.1-2, p.69-93, 2000.
- STEAD, S.L., ASHWIN, H., RICHMOND, S.F., SHARMAN, M., LANGEVELD, P.C., BARENDSE, J.P., STARK, J., KEELY, B.J. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal*, v.18, n.1, p.3-11, 2008.
- STELLA, A.E., RIGOBELLO, E.C., OLIVEIRA, A.C., MALUTA, R.P., MARIN, J.M., ÁVILA, F.A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, p.66-74, 2008.
- SUHREN, G., KNAPPSTEIN, K., Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods. *Analyst*, v.123, p.2797-2801, 1998.
- TOUSSAINT, B., CHEDIN, M., BORDIN, G., RODRIGUEZ, A.R. Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: I. Laboratory-validated method *Journal of Chromatography A*, v.1088, n.1-2, p.32-39, 2005.
- VIÑAS, P., BALSALOBRE, N., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods. *Talanta*, v.72, n.2, p.808-812, 2007.
- WANG, S., XU, B., ZHANG, Y., HE, J.X. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Science*, v.82, n.1, p.53-58, 2009.
- WHITTEM, T., HANLON, D. Dihydrostreptomycin or streptomycin in combination with penicillin in dairy cattle therapeutics: a review general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In and re-analysis of published data, Part 1: Clinical pharmacology. *New Zealand Veterinary Journal*, v.45, p.178-184, 1997.

- WOODWARD, K.N., SHEARER, G. Antibiotic use in animal production in the European Union – Regulations and current method for residue detection. In: OKA, H., NAKAZAWA, H., HARADA, K.I., MACNEIL, J.D. Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture. Arlington: AOAC International, 1995, cap.3.
- YORKE, J.C., BLOT, J., MARIS, P. Liquid chromatographic determination of aminoglycoside residues in milk and muscle tissue. Community Reference Laboratory for Veterinary Drug Residues. 2000. Disponível em: http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Contributions%20I-Z/Yorke%201137-1141.pdf. Acesso em 22 de abril de 2009.

CAPÍTULO II

Development and Validation of a LC-APCI-MS/MS QToF Analytical Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk

Trabalho aceito para publicação no *Journal of Chromatographic Science*

Development and Validation of a LC-APCI-MS/MS QToF Analytical Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk

Abstract

An analytical method for the quantification and identity confirmation of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in pasteurized milk using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization (APCI) - tandem mass spectrometry (QToF) was developed and validated. Method validation was performed according to the recommendations of the international agencies (European Community and IUPAC) and the following parameters were evaluated: analytical curve, linearity, sensitivity, precision (intra and inter-day repeatability), accuracy and the detection and quantification limits. Simple sample preparation was followed by the LC-APCI-MS/MS QToF analysis. The method presented adequate linearity with correlation coefficients above 0.99 for both analytes in the dynamic range of 50 - 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and average accuracies between 84 and 110%. The detection and quantification limits were, respectively, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for both analytes. Method selectivity was verified by the absence of interfering peaks in the retention regions of the analytes and the internal standard when a blank sample was tested. The results qualified the method for the quantification and confirmation of the analytes in milk at concentrations inferior to the established LMR (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Introduction

Streptomycin is an aminoglycoside produced by some *Streptomyces griseus* strains and dihydrostreptomycin is the product of its catalytic hydrogenation. Aminoglycosides are protein synthesis inhibitors and, in spite of their toxicity, are widely used in veterinary medicine for the treatment of aerobic Gram-negative bacterial infections such as clinical and sub clinical mastitis in cattle, normally being used in association with penicillin and tetracycline. All aminoglycoside antibiotics present the same toxicity spectrum [1] and the most evident adverse effects are nephrotoxicity and ototoxicity [2].

The incorrect usage of antimicrobial agents in cattle or the non observation of the withdrawal time after treatment may result in the presence of residues of these substances in the milk, increasing the risk to consumer health due to their toxicity and possible allergic reactions in sensitive people. In addition such residues promote bacterial resistance, as previously reported in the literature [3-5], and cause negative effects in the dairy industry, inhibiting totally or partially the cultures employed in cheese and yogurt production [6, 7].

The use of streptomycin is allowed in the European Union (EU) and the maximum residue limit (MLR) for streptomycin together with dihydrostreptomycin in milk is 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [8]. The same MRL was adopted in the MERCOSUL Resolution GMC n° 54/2000 [9].

In 1986 the Brazilian Ministry of Agriculture (MAPA) established the National Plan for the Control of Residues in Edible Products of Animal Origin – PNCR [10, 11]. Furthermore, in 2003, the Brazilian Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) created the National Plan for the Analysis of Veterinary Drug Residues in Food Exposed to Consumption – PAMVET, which describes the control of veterinary drug residues in edible products of animal origin for human consumption [12]. Aminoglycosides are highlighted in these programs, both streptomycin and dihydrostreptomycin being indicated as substances to be evaluated in milk.

The control of antimicrobial agent residues in edible products of animal origin requires the development of selective analytical methods that present adequate detectability. Liquid chromatography attached to tandem mass spectrometry is recognized as a very selective technique, and can be employed to analyze aminoglycosides in food products, it being possible to quantify and confirm the identity of these substances at very low concentrations. LC-MS/MS methods for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin with quantification limits lower than 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ have been reported [13-15]. Nevertheless, the sample preparation is normally time-consuming, involving deproteinization and solid phase extraction steps. In addition, the majority of the analytical methods involving LC-MS/MS published employ triple quadrupole (QQQ) analyzers. Nevertheless, the ability of time of flight (ToF) analyzers to provide high quality results, due to their exact measurement of the analyte mass, make them instruments of great interest to take part in confirmatory analysis methods with legislative perspectives, such as those required by the European Union [16].

The aim of the present work was to develop and validate an analytical method with a simple and fast sample preparation step, to identify and quantify streptomycin and dihydrostreptomycin residues in pasteurized milk at concentration levels below the MRL [17, 18], thus being adequate for adoption in veterinary drug residue monitoring programs.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Pasteurized milk samples were acquired from local markets in the city of Campinas, SP, Brazil. These samples were separated into aliquots and stored at 5 ± 2 °C before being analyzed.

Solvents and Reagents

Trichloroacetic acid (TCA) was purchased from Acros Organics (USA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) from Sigma-Aldrich (Germany), both of analytical grade. HPLC grade acetonitrile (ACN) was obtained from J.T. Baker (USA). The Milli-Q Plus System (Millipore – USA) was used to purify the distilled water.

Polyvinylidene difluoride (PVDF) Hydrophilic and Polytetrafluorethylene (PTFE) membranes (Millipore – USA), both with 0.22 μm pore sizes, were used to filter the aqueous and organic mobile phase solutions, respectively. Polyvinylidene difluoride (PVDF) Hydrophilic (Millipore – USA) syringe filters, 33 mm diameter, 0.22 μm pore size, were used to filter the sample extracts before injection.

Standard Solutions

Streptomycin sulfate (STP) (99.9%), dihydrostreptomycin sesquisulfate (DHSTP) (98.0%) and tobramycin (TOB) (99.9%) analytical standards were obtained from Sigma-Aldrich.

Stock solutions of 1000 mg kg^{-1} were separately prepared by dilution of STP or DHSTP in solution of water:methanol (1:1, v/v), and stored in tightly closed amber vessels at 5 $^{\circ}\text{C}$ for a maximum period of six months [19].

Working solutions containing 12.5, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 125.0, 150.0 and 200.0 mg kg^{-1} of STP and DHSTP were prepared weekly by dilution of the stock solutions in solution of water:methanol (1:1, v/v) and stored in tightly closed amber vessels at 5 $^{\circ}\text{C}$. These solutions were used to construct calibration curves for both analytes, by spiking blank milk samples at five concentration levels (50.0, 100.0, 200.0, 300.0 and 400.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The internal standard (TOB) was also spiked in the blank milk samples at a concentration of 2.5 mg kg^{-1} . This high concentration was chosen because the ionization conditions established for analytes are not ideal for the internal standard. The analytical curves were constructed on the same day, as the spiked samples were prepared.

Instruments

A Waters Alliance 2695[®] HPLC system (Waters, USA), composed of quaternary pumping and automatic injection systems was employed for the chromatographic separation. The HPLC system was interfaced with electrospray (ESI) or atmospheric pressure chemical (APCI) ionization sources, followed by the hybrid QToF Micro[®] (Micromass, UK) mass spectrometer, composed of a quadrupole (Q) and a time of flight (ToF) analyzers with a hexapole collision cell between them. The data were acquired using the Masslynx[®] software (Micromass, UK).

A model T14 ultrasound bath (Unique Thornton, Brazil) was used for the degasification of the mobile phase solutions. A model BL 2105 analytical balance (Sartorius, Germany) was used to weigh the reagents and standards. A model 204-NR centrifuge (Fanem, Brazil) and a model MA120 rotary evaporator (Marconi, Brazil) were employed for sample preparation.

Sample Preparation

Two milliliters aliquots of the blank or spiked milk samples were placed in twelve milliliters centrifuge tubes and 0.4 mL of TCA solution (10% v/v) was added. The samples were homogenized in a vortex mixer for 3 min and then centrifuged at 3600 g for 10 minutes. The supernatants were filtered using 0.22 µm pore size syringe filters and injected into the HPLC system.

For optimization of the sample preparation procedure, several concentrations of aqueous and methanolic TCA solutions were tested. Deproteinization with acetonitrile instead of TCA was also tried, and additional C₁₈ solid phase extraction and partitioning with some organic solvent cleaning steps were also evaluated. None of these improved the extraction efficiency, which was expressed as the percentage of the expected concentration (obtained with external calibration

curves, in which the analytes were diluted in water: methanol – 1:1 v/v), after analysis of the spiked samples using the method developed.

LC-MS/MS QToF Conditions

For the chromatographic separation, a C₁₈ XTerra® MS (150 x 2.1 mm, 5 µm – Waters, USA) reversed phase column was used, at 30 °C. Aqueous 10 mmol⁻¹ HFBA (solvent A) and 10 mmol⁻¹ HFBA in acetonitrile (solvent B) constituted the mobile phase, using the gradient shown in Table I at a constant flow rate of 200 µL min⁻¹.

Table I. Elution Gradient for the chromatographic analysis of STP and DHSTP.

Time (min.)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	75	25
3	75	25
10	64	36
15	75	25

Both positive mode ESI and APCI ionization sources were evaluated. An optimized APCI signal was achieved under the following tuning conditions: 0.5 µA of corona current, sample cone at 50 V, extraction cone at 2 V, source temperature of 150 °C, probe and dessolvation temperatures of respectively 650 °C and 150 °C, ion and collision energies of, respectively 2 V and 7 V and cone and dessolvation gas flows of, respectively 0 and 100 l h⁻¹. For ESI, the best signal conditions were: probe voltage of 2700 V, sample cone at 65 V, extraction cone at 0 V, source and dessolvation temperatures of, respectively 100 °C and 250 °C, ion and collision energies of, respectively 1 V and 20 V and cone and dessolvation gas flows of, respectively 50 and 500 l h⁻¹. For both ionization sources detection was performed monitoring the protonated [M-H]⁺ molecules of the analytes (STP and DHSTP) and the sodium adduct [M-Na]⁺ of the internal standard (TOB) by MS/MS in the acquisition mode, which presented the respective m/z ratios: 582.3, 584.3 and 490.1.

The quantitative analysis was performed using the analytical curves of the spiked samples, with the analyte and internal standard concentrations mentioned above. Confirmation was achieved under the same APCI ionization conditions with the collision energy at 28 V for STP, which was the best tuning for the simultaneous detection of the fragment ions with m/z ratios of 263.1 and 407.2 (besides the protonated molecule); and 25 V for DHSTP, which was the best tuning for the simultaneous detection of the fragment ions with m/z ratios of 263.1 and 409.2 (besides the protonated molecule).

Method Validation

Method validation was performed according to the main international regulatory agencies, such as the European Community [16] and the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [20]. The selectivity, analytical curve, linearity, sensitivity, precision (intra and inter-day repeatability), accuracy, matrix effect, and the detection and quantification limits of the parameters were evaluated using spiked samples at several concentration levels.

For both analytes, spiked samples at five concentration levels in a range that included the MRL, were used to construct the analytical curves and determine the linearity and sensitivity. The data was analyzed using the quantification software Quanlynx[®] (Micromass, UK).

Method selectivity was evaluated by verifying the absence of interfering substances that could possibly compromise the identification or quantification of the analytes or the internal standard in five blank samples.

The precision was determined in two steps: (i) inter-day repeatability: from the variation in results of four replicates, analyzed on the same day by the same analyst and using the same instrument; and (ii) inter-day repeatability: from the variation in results of three analyses, performed on three different days ($n=3$) by the same analyst and using the same instrument. For this purpose, blank samples

were spiked with both analytes at 50, 100, 200 and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (equivalent to 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 times the MRL, respectively).

Accuracy was evaluated by recovery tests, analyzing samples spiked with the same concentration levels used in the precision tests. The results were expressed as the percentage of the expected concentrations (the amounts initially added) of the analytes.

Blank pasteurized milk samples were submitted to the established sample preparation procedure to evaluate the matrix effect. After the extraction step, the supernatant was evaporated to dryness at 45 °C, and the analytes (residues from 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of the analytes and 2.5 mg kg^{-1} of the internal standard) re-suspended in 1.0 mL of a water:methanol (1:1, v/v) solution. The results were obtained by comparison with those obtained by external calibration (analytical standards in pure solvent), and expressed as the percentage difference from the expected concentrations.

The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were obtained by analyzing samples spiked at decreasing concentration levels, evaluating the precision and accuracy of the results. Each analyte LOD was expressed as the minimum detectable concentration in the spiked sample. LOQs were expressed as the minimum concentrations that could be quantified in the spiked samples with adequate precision and accuracy.

Results and Discussion

Sample preparation was carried out by acid precipitation of the milk proteins, in which the analytes were extracted with adequate efficiency (71-104% for STP and 78-107% for DHSTP), no complementary SPE or partition cleaning steps being needed. The analyte and internal standard recoveries were zero for extraction by deproteinization with acetonitrile.

The APCI source presented signal intensities for the analytes in the mass spectra approximately three times higher than the ESI source, consequently

promoting better sensitivity in the chromatograms (Figures 1 and 2: observe the TIC – total ion count), and was therefore chosen as the ionization source for the method.

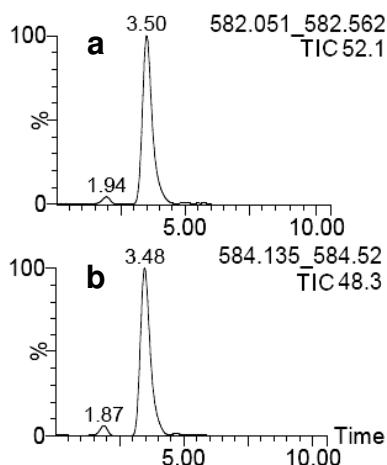


Figure 1. STP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (b) in standard solution extracted mass chromatograms. ESI ionization.

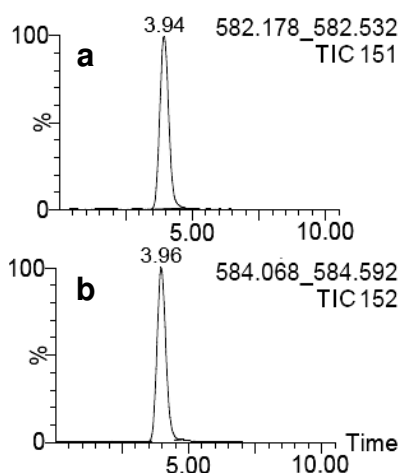


Figure 2. STP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (b) in standard solution extracted mass chromatograms. APCI ionization.

The tests with the ESI source showed sharp ionic suppression of the analyte signal by the matrix, this effect was evaluated and quantified as 69% for STP and 52% for DHSTP (Table II). It was observed that the suppression effect was due to an ion with a m/z ratio of 365, which appeared at the same retention time as the analytes. The collision energy was increased in order to evaluate the fragmentation

pattern of this substance, however, even after a significant increment in the collision energy (from 7 to 35 V), no fragment ion was observed, which is a characteristic behavior of sodium adduct ions. Considering that lactose is the main sugar in the chemical composition of milk (2-8% of the milk by weight) and that its molar mass with the addition of the sodium molar mass is exactly 365 g mol^{-1} , the hypothesis of the suppression being caused by lactose was investigated. Indeed, the isotopic profile of the interfering ion coincided with the isotopic profile of lactose $[\text{M-Na}]^+$ as simulated by the *Masslynx*[®] software (Figure 3), with a 1.1 ppm error in mass accuracy, and presenting approximately 12% of ions with an m/z ratio of 366, which is an indication of 12 carbons in its molecular composition (equivalent to two hexoses). All these factors corroborated the theory that the suppression really was caused by lactose.

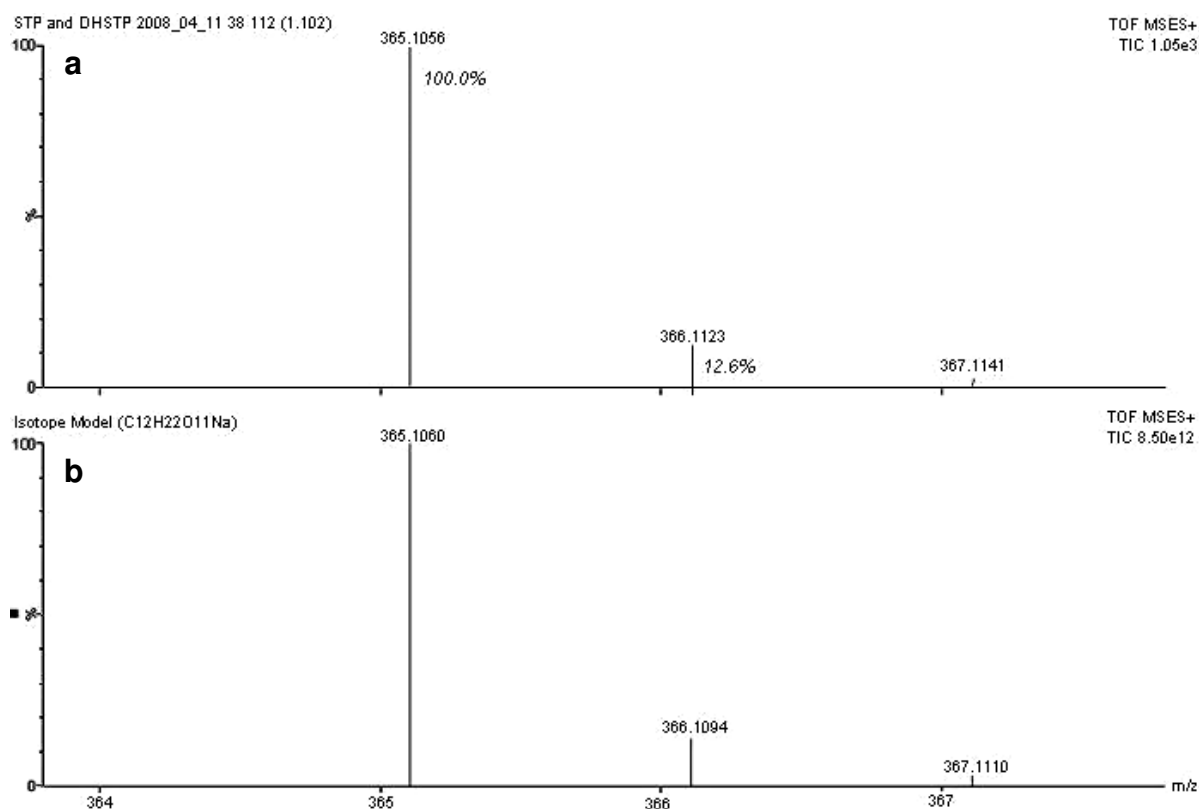


Figure 3. (a) Isotopic profile of the suppressing interfering ion ($m/z = 365$), obtained from the LC-ESI-MS/MS analysis of a blank milk sample after the extraction procedure, and (b) the isotope model of the lactose sodium adduct ion, simulated by *Masslynx*[®].

The identification of the interfering ion was necessary to establish new alternatives for the extraction procedure that could possibly separate it from the analytes, and when the APCI source was tested, the matrix effect showed an important improvement (Table II), indicating less ionic suppression of the analyte signals using this ionization source (Figures 4 and 5).

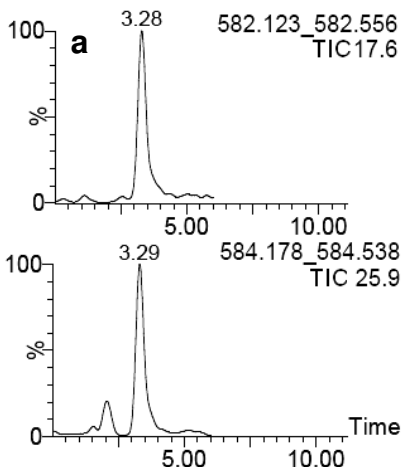


Figure 4. Spiked milk sample chromatograms - STP $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ (b). ESI ionization.

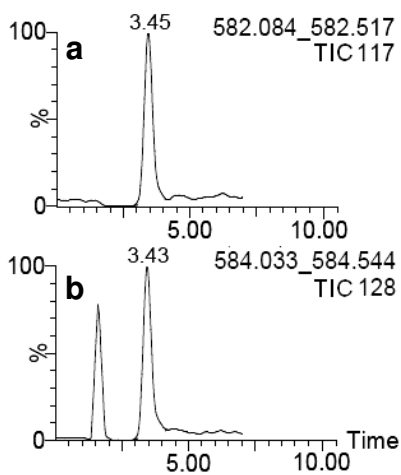


Figure 5. Spiked milk sample chromatograms - STP $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ (a) and DHSTP $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ (b). APCI ionization.

Table II. Matrix effects for STP and DHSTP, obtained using ESI and APCI ionization for spiked milk samples

Ionization Source	Matrix Effect (%)	
	STP	DHSTP
ESI	69	52
APCI	25	21

Figure 6 shows the fragmentation spectra for STP and DHSTP, obtained using APCI ionization under the ideal fragmentation conditions. Besides the protonated analyte (m/z ratio = 582.3), fragment ions with m/z ratios 263.1 and 407.2 were used to confirm the STP identity. For the confirmation of DHSTP, the protonated analyte and two fragment ions were observed, with m/z ratios of 584.3, 263.1 and 409.2 respectively.

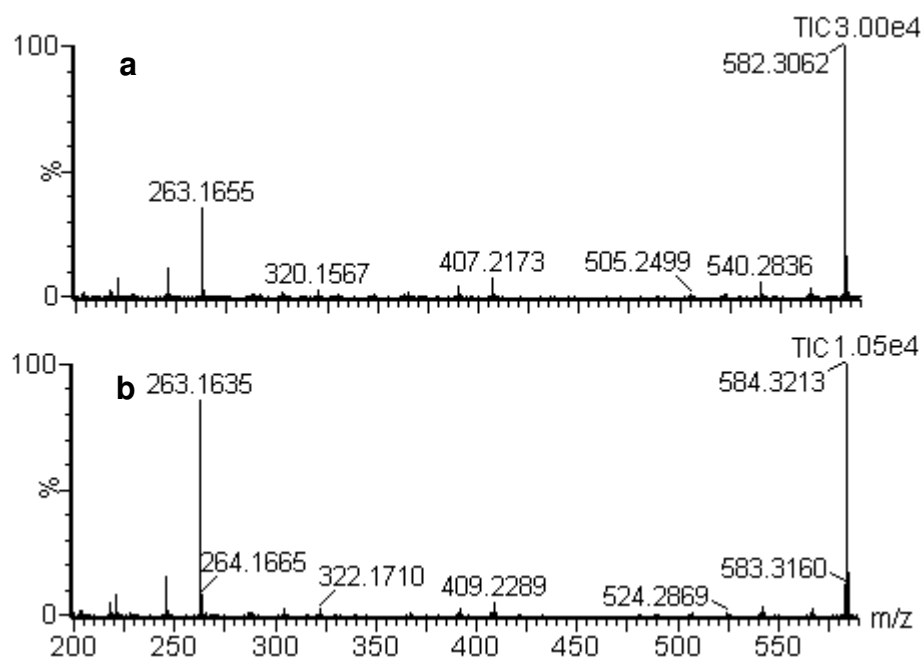


Figure 6. STP (a) and DHSTP (b) fragmentation spectra, obtained using LC-APCI-MS/MS QToF.

According to the European Community regulation (2002), confirmatory methods for organic residues in food matrices must provide molecular structural information, and MS detection is recognizably capable of that. MS techniques

showing less resolution, such as the triple quadrupole one (QQQ), may satisfy the confirmation criteria based on established systems of identification points, which are related to the masses of the fragment ions from the analytes [21, 22]. For these techniques, a minimum of three ions is necessary for the confirmation of permitted substances, and four fragment ions for the banished compounds [16]. The use of QToF systems may reach the minimum points for identification by the sum of just two ions: the (de)protonated or the molecular ion, and one fragment ion [23].

The quantitative analysis presented adequate linearity, with correlation coefficients (r) higher than 0.99 for both analytes in the dynamic range of 50 to 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Calibration curves (Figures 7 and 8) were constructed in the matrix to guarantee reliability of the results.

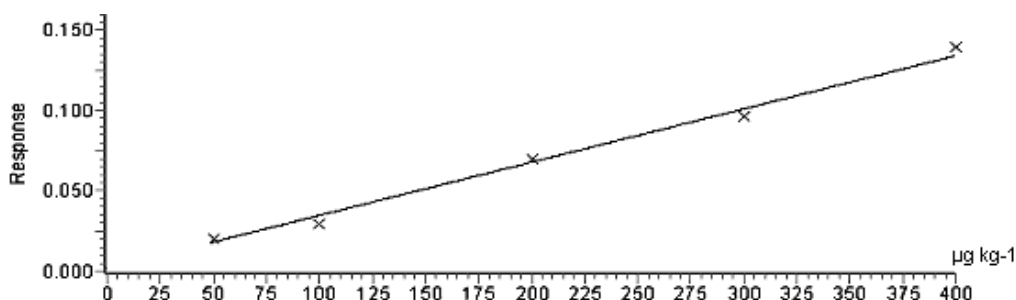


Figure 7. Analytical curve for STP. Dynamic range: 50 to 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Correlation coefficient (r) = 0.99.

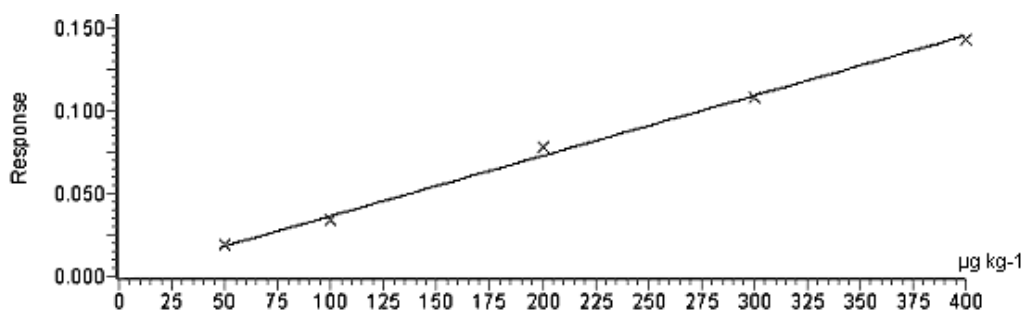


Figure 8. Analytical curve for DHSTP. Dynamic range: 50 to 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Correlation coefficient (r) = 0.99.

The results for accuracy and precision (Table III) were in accordance with the EU decision n° 2002/657 [16]. The average results for recovery were between 84 and 110%. Precision was demonstrated from the relative standard deviations in the intra and inter day repeatability tests, which were lower than 15% for concentrations above 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and 20% for concentrations below this value.

Table III. Accuracy and precision results obtained in the intra and inter day assays.

STP and DHSTP concentrations in milk	Accuracy (Recovery, %)		Precision (RSD, %)	
	STP	DHSTP	STP	DHSTP
Intra day repeatability				
50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	109.8	107.6	15.6	12.9
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	95.3	90.0	9.1	11.5
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	100.3	103.7	3.7	10.6
300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	90.0	84.2	10.5	14.3
Inter day repeatability (3 days)				
50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	105.9	108.6	19.2	19.8
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	110.0	103.0	14.3	14.5
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	100.8	102.5	7.3	4.1
300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	108.3	105.6	11.0	8.9

The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits obtained, 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively, were way below the MRL defined for both STP and DHSTP in milk (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Method selectivity was verified by the absence of interfering peaks in the blank sample extracted mass chromatograms in the areas around the retention times of the analytes, as shown in Figures 9 and 10.

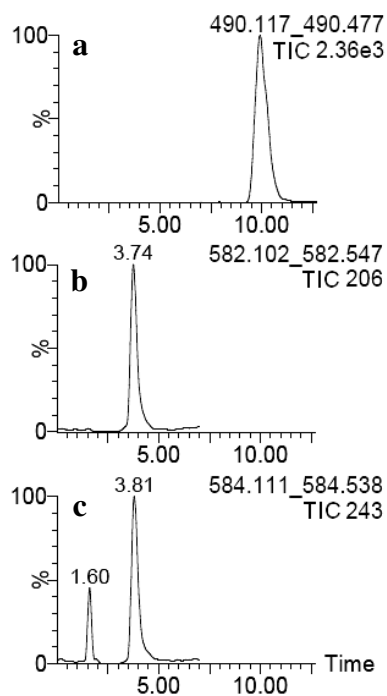


Figure 9. Extracted mass chromatograms of milk samples spiked with TOB 2.5 mg kg⁻¹, STP 200 µg kg⁻¹ and DHSTP 200 µg kg⁻¹: m/z ratios of 490.1 (a), 582.3 (b) and 584.3 (c), respectively.

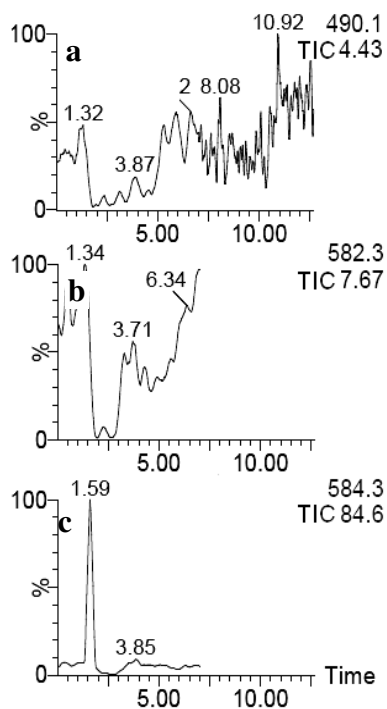


Figure 10. Extracted mass chromatograms of blank samples: m/z ratios of 490.1 (a), 582.3 (b) and 584.3 (c).

Conclusions

The sample preparation procedure developed was simple, which is crucial for a faster analysis less susceptible to analyte losses, and resulted in adequate extraction efficiency (71 to 104% for STP and 78 to 107% for DHSTP).

The method linearity was adequate, with correlation coefficients above 0.99 for both analytes in the linear range from 50 to 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The precision was verified from the values obtained for the RSDs in the intra and inter day repeatability assays, which were lower than 15% for concentrations above 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and lower than 20% for concentrations below this level. These results are in accordance with the EU recommendations (2002). The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The method presented accuracy values in the range from 84 to 110%.

The method allowed for the monitoring of the protonated molecules and two fragment ions for each analyte, achieving the purpose of confirming the identity of the analytes according to the EU (2002) recommendations.

The validation results showed that the method developed was adequate for the quantification and confirmation of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in pasteurized milk, at concentrations lower than the established MRL for these substances (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from CNPq, CAPES and FAPESP and Professor Hilary Castle de Menezes for language assistance.

References

1. H.F. Chambers. Antimicrobianos: Os Aminoglicosídeos. In: A. G. GILMAN, J.G. HARDMAN, L.E. LIMBIRD. As Bases Farmacológicas da Terapêutica 10ed. McGraw-Hill Rio de Janeiro, Brasil, 2001, pp. 913-928.
2. FAO/WHO – Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods, Monographs prepared by the 52nd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome: JECFA, 1999, 133 p.
3. M.R. Baccaro, A.M. Moreno, A. Corrêa, A.J.P. Ferreira, F.F. Calderaro. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. Arq Inst. Biol. 69(2):15-18 (2002).
4. A.R. Ribeiro, A. Kellermann, L.R. Santos, A.P. Fittél, V.P. Nascimento. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. Arq. Inst. Biol. 73(3):357-360 (2006).
5. A.E. Stella, E.C. Rigobelo, A.C. Oliveira, R.P. Maluta, J.M. Marin, F.A. ÁVILA. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Vet. Zootec. 15:66-74 (2008).
6. J.M. Mitchell, M.W. Griffiths, S.A. Mcewen, W.B. McNab, A. Yee. Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. J. Food Prot. 61(6):42-745 (1998)
7. M.A.V.P. Brito. Resíduos de antimicrobianos no leite. Circular Técnica Embrapa Gado de Leite, n. 60, 2000. 20 p.
8. Comunidade Européia - Comissão Regulation (EEC) 2377/90. Off. J. Eur. Commun. L224, n.1, 1990.
9. MERCOSUL – Mercado Comum do Cone Sul. Metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Resolução 54/2000, [s.n.l.], 2000.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2631>. (Accessed September 1, 2008).
11. BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria Nº 527, de 15 de agosto de 1995. Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16313>. (Accessed September 1, 2008).
12. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao

- Consumo – PAMVet, Brasília, Novembro de 2003. Available at <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>. (Accessed September 1, 2008).
- 13 M. van Bruijnsvoort, S.J.M. Ottik, M.J. Klaas, E. Boer. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1058:137-142 (2004).
 - 14 S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganà, M. Mele, M. Nazzari. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1067:93-100 (2005).
 - 15 D.N. Heller, J.O. Peggins, C.B. Nochetto, M.L. Smith, O.A. Chiesa, K. Moulton. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. *J. Chromatogr. B* 821:22-30 (2005).
 - 16 Comunidade Européia - Decisão da Comissão 657/2002. *J. Ofic. Comun. Eur.* L221/8, 2002.
 - 17 BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Anexo IV. Available at <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717>. (Accessed September 1, 2008).
 - 18 Codex Alimentarius. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 2ed., v. 3, Roma: Codex Alimentarius, 1993.
 - 19 M. Horie, H. Saito, T. Natori, J. Nagata, H. Nakazawa. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat Tech.* 27(5):863-874 (2004).
 - 20 M. Thompson, L. R. Stephen, R. Wood. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74:835 (2002).
 - 21 A.A. Bergwerff, P. Scherpenisse. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatog. B.* 788:351-359 (2003).
 - 22 K. Halme, E. Lindfords, K. Peltonen. Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 21:641-648 (2004).
 - 23 M.D. Hernando, M. Mezcua, J.M. Suarez-Barcena, A.R. Fernández-ALBA. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous

determination of chemotherapeutant residues in salmon. *Anal Chim. Acta* 562:176-184 (2006).

CAPÍTULO III

Ocorrência de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite comercializado na região de Campinas, SP.

Ocorrência de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite comercializado na região de Campinas, SP.

Resumo

Estreptomicina e diidroestreptomicina são antimicrobianos amplamente utilizados na bovinocultura leiteira para a prevenção e tratamento de infecções bacterianas. O uso indevido dessas substâncias pode levar à presença de resíduos acima dos limites permitidos na carne, fígado, rim e leite. O controle da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é indispensável para a garantia da inocuidade alimentar para segurança da saúde do consumidor e competitividade no mercado internacional. O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de leite bovino pasteurizado, comercializadas na região de Campinas, SP, quanto à presença de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina. Para triagem, foi utilizado um kit comercial de teste do tipo ELISA, e um método de LC-APCI-MS/MS QToF, foi empregado para análise confirmatória. Para tanto, ambos os métodos foram validados. Os resultados da validação dos métodos de ELISA e LC-MS/MS demonstraram que estes são adequados para as análises de triagem e confirmatória, respectivamente, de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite pasteurizado, em níveis de concentração inferiores ao limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido para essas substâncias ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nas amostras analisadas não foram encontrados resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em níveis detectáveis.

Abstract

Streptomycin and dihydrostreptomycin are antimicrobial agents widely used in dairy cattle for the prevention and treatment of bacterial infections. The improper use of these substances can result in the presence of residues above the maximum limits established for meat, kidney, liver and milk products. Control of veterinary drug residues in food is essential to ensure food quality for human health and competitiveness in international commerce. The aim of this work was to analyze pasteurized bovine milk samples marketed in the region of Campinas, São Paulo, for the presence of streptomycin and dihydrostreptomycin. For trial analysis a commercial ELISA kit was employed, and LC-APCI-MS/MS QToF was used for confirmatory analysis. Both methods were validated. The results demonstrated the effectiveness of the ELISA and LC-MS/MS methods for trial and confirmatory analyses, respectively, for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk at concentrations below the established maximum residue limit (MRL) ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$). In the samples analyzed, streptomycin and dihydrostreptomycin were not found at detectable levels.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento básico de consumo mundial e a sua produção vem apresentando um aumento contínuo segundo os dados estatísticos da organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), reportados pela EMBRAPA (2008).

Os antimicrobianos, que são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, são utilizados na bovinocultura leiteira para a prevenção e/ou tratamento de infecções bacterianas, como a mastite – principal responsável por perda econômica nesse sistema de produção no mundo todo (NUÑES et al, 2001). Entre os antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite bovina por via intramamária ou sistêmica, se destacam a estreptomicina e a diidroestreptomicina, pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, que são antimicrobianos de baixo custo. Esses antimicrobianos exibem atividade contra o crescimento de bactérias aeróbias, principalmente as gram-negativas, através da inibição irreversível da síntese protéica bacteriana (SAMANIDOU e EVAGGELOPOULOU, 2007). No entanto, o uso indiscriminado dessas substâncias pode levar à presença de resíduos na carne, fígado, rim e leite, decorrente do não cumprimento das Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, como a negligência das especificações e recomendações de uso de cada medicamento, como via de administração, dose de tratamento, períodos de tratamento e de carência.

A presença de resíduos de aminoglicosídeos acima do LMR, no leite, representa risco à saúde dos consumidores devido à toxicidade e a possibilidade de ocorrência de reações alérgicas, além de propiciar o desenvolvimento de resistência bacteriana (BACCARO et al, 2002, RIBEIRO et al, 2006, STELLA et al, 2008). As alergias aos aminoglicosídeos não são muito comuns, porém, ocorrem ocasionalmente, podendo resultar em erupções cutâneas (COSTA et al, 1999a).

Com o intuito de se garantir a saúde do consumidor e a qualidade dos alimentos, foram definidos níveis de tolerância quanto à presença de resíduos de

antimicrobianos em alimentos, denominados Limites Máximos de Resíduos (LMR). O Codex Alimentarius, a Comunidade Européia e o MERCOSUL estabeleceram um valor de LMR para a soma de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CE, 1990; MERCOSUL, 2000; Codex Alimentarius, 2006).

O controle da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos tem como objetivo a garantia da inocuidade alimentar e a segurança do consumidor, sendo também indispensável em países que buscam a competitividade no mercado internacional (MARTINS JUNIOR et al, 2006).

No Brasil, foram criados o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR (BRASIL, 1986, BRASIL, 1995), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que prevê a adoção de programas setoriais para carne, mel, leite e pescado; e o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet), estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, com o objetivo de controlar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano (ANVISA, 2003a).

Para a análise de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite, estão disponíveis diversos métodos de análise, tanto para triagem, como métodos confirmatórios (STEAD, 2000). De acordo com a Comunidade Européia (2002), os métodos de triagem têm capacidade de selecionar as amostras que apresentam resultados não conformes, e os métodos confirmatórios são aqueles que fornecem informações completas ou complementares aos testes de triagem para a identificação inequívoca dos analitos. Ambos os tipos de métodos, necessariamente, precisam ser capazes de determinar os analitos alvos em concentrações a níveis requeridos (resíduos, $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS), tem se mostrado o método mais adequado para a análise confirmatória de aminoglicosídeos em leite por proporcionar alta detectabilidade e alta seletividade, permitindo o emprego de procedimentos simples de preparo de

amostras, o que resulta em um menor tempo de análise. No entanto, quando é necessária a análise de grande quantidade de amostras para controle da qualidade dos alimentos, os métodos de triagem oferecem grande vantagem de emprego por permitirem o uso de técnicas mais simples e de menor custo, entre as quais se destaca o ensaio imunoenzimático (ELISA).

O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de leite bovino pasteurizado, comercializadas na região de Campinas, SP, utilizando um kit comercial de enzima imunoensaio (ELISA) como triagem, e um método de LC-APCI-MS/MS QToF para confirmação dos resultados. Para tanto, ambos os métodos empregados (triagem e confirmatório) foram validados intra-laboratorialmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas amostras de leite pasteurizado adquiridas aleatoriamente, durante o mês de maio de 2009, em supermercados e padarias da região de Campinas, SP (Americana, Campinas, Paulínia, Nova Odessa e Limeira).

No total, foram analisadas 299 amostras, de 18 marcas diferentes de leite, considerando o nível de confiança de 95%, com frequência estimada de 1% de casos de níveis superiores aos limites estabelecidos conforme recomendações do Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1993). Dentre as amostras, 174 eram de leite integral (mínimo 3% de gordura), 49 de leite semi-desnatado (0,6 à 2,9% de gordura), 28 de leite desnatado (máximo 0,5% de gordura) e 48 de leite padronizado (3% de gordura). A figura 1 apresenta a região de Campinas, com as cidades em que foram realizadas as coletas de amostras.



Figura 1. Mapa da região de Campinas, com destaque para as cidades em que foram coletadas as amostras. Fonte: Guia Geográfico.

A maioria das amostras foi coletada em Campinas (84%) e Americana (8%). Na cidade de Campinas, as amostras foram coletadas em 14 bairros diferentes, entre eles, Barão Geraldo (56%), Jardim Brasil (20%) e Castelo (9%) (Figura 2).

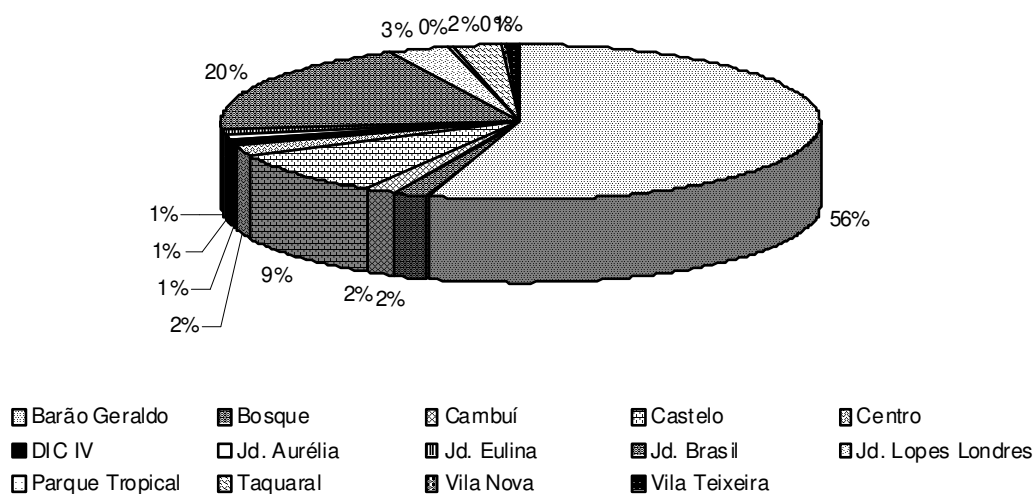


Figura 2. Distribuição das amostras em relação aos bairros de Campinas em que foram adquiridas.

Após homogeneização do conteúdo das embalagens (1 L), as amostras foram divididas em duas alíquotas, sendo uma de 5 mL (A1), armazenada em tubo de polietileno, sob refrigeração (3 a 8 °C) até o momento das análises, e outra de 30 mL (A2), que foi transferida para tubo de polietileno e armazenada em freezer (-20 °C) para utilização em posterior confirmação dos resultados.

Amostras livres de STP e DHSTP foram utilizadas como amostras branco de leite para o procedimento de validação dos métodos de triagem (ELISA) e confirmatório (LC-MS/MS).

Solventes e Reagentes

Para análise por LC-APCI-MS/MS QToF e validação do teste ELISA, foram utilizados os padrões analíticos: sulfato de estreptomicina (STP) (99,9%), sesquissulfato de diidroestreptomicina (DHSTP) (98%) e tobramicina (TOB) (99,9%), todos da marca Sigma-Aldrich, Alemanha.

Foi utilizado um kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo competitivo, da marca RIDASCREEN®, produzido pela r-Biopharm, Alemanha, para a determinação de estreptomicina e diidroestreptomicina em amostras de leite.

Para o preparo do tampão de diluição do leite empregado no teste de ELISA, foram utilizados sais cloreto de sódio e fosfato de sódio monobásico monoidratado da marca J. T. Baker (USA) e fosfato de sódio dibásico heptaidratado da marca Ecibra (Brasil), todos de grau analítico. Foi utilizado, ainda, Tween 20 da marca Fluka (USA).

Para as análises por LC-MS/MS foram utilizados o ácido tricloroacético (TCA) da marca Acros Organics (USA) e o ácido Heptafluorobutírico (HFBA) da marca Sigma-Aldrich (Alemanha), ambos de grau analítico. A acetonitrila (ACN) de grau HPLC utilizada foi da marca J. T. Baker (USA).

Antes das análises cromatográficas, a fase móvel foi filtrada sob vácuo através de membranas (0,22 µm de diâmetro) de fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF) (Millipore – USA) para soluções aquosas, e politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore – USA) para solventes orgânicos. Filtros de seringa com membranas de fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), poros de 0,22 µm de diâmetro, (Millipore – USA) foram utilizados para filtração das amostras antes das análises.

Soluções padrão

Para o procedimento de análise das amostras por ELISA, foram utilizadas as soluções padrão contidas no kit, de concentrações 0, 0,5, 1,5, 4,5, 13,5, 40,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

As soluções estoques (1000 mg kg^{-1}) de STP, DHSTP e TOB foram preparadas, separadamente, em água, armazenadas em frascos âmbar, devidamente vedados, sob temperatura de 3 a 8 °C, e utilizadas por um período máximo de seis meses (HORIE et al, 2004). A partir dessas soluções foram preparadas, semanalmente, soluções de trabalho contendo 12,5, 25, 50, 75, 100, 150 ou 200 mg kg^{-1} de STP e DHSTP em água, que foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas sob temperatura de 3 a 8 °C.

As soluções de trabalho de STP e DHSTP e a solução estoque do padrão interno (TOB) foram empregadas na elaboração das curvas analíticas de ambos os analitos. As curvas foram preparadas mediante fortificação das amostras branco de leite, com os analitos em diferentes níveis de concentração.

Para validação do kit de ELISA, realizada para cada analito sem o emprego de padronização interna, foram preparadas amostras fortificadas com STP ou DHSTP em seis níveis de concentração (25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Para análise por LC-MS/MS as amostras foram fortificadas com ambos os analitos em cinco níveis de concentração (50, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) TOB na concentração de 2,5 mg kg^{-1} , para construção das curvas analíticas. As curvas analíticas foram preparadas e utilizadas nas análises no mesmo dia.

Equipamentos

Para leitura das placas de ELISA foi utilizada leitora Stat Fax® 303 Plus (Awareness Technology, Inc., USA), com filtro de 450 nm.

As análises confirmatórias foram realizadas em um equipamento LC-MS/MS QToF micro (Waters, USA), composto por um sistema de bombeamento quaternário, um sistema de injeção automática, interface de ionização química a pressão atmosférica (APCI), e um espectrômetro de massas híbrido, composto por dois analisadores de massas em série: quadrupolo (Q) e tempo de voo (*Time of Flight*, ToF).

Banho de ultrassom modelo T14 (Unique Thornton, Brasil) foi usado para a degaseificação das soluções da fase móvel. Para o preparo das soluções foi utilizada balança analítica modelo BL 2105 (Sartorius, Alemanha), e sistema Milli-Q, modelo Plus (Millipore, USA). No preparo de amostras foi utilizada centrífuga modelo 204-NR (Fanem, Brasil), e rotaevaporador modelo MA 120 (Marconi, Brasil).

Análise de amostras por ELISA

O preparo das amostras foi realizado de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante do kit RIDASCREEN® (r-Biopharm, Alemanha). Para isso, o tubo A1, refrigerado (3 a 8 °C), foi submetido à centrifugação à 3000 g, durante 10 minutos. A partir de cada tubo de amostra foram utilizados 50 µL para diluição em 950 µL de tampão de diluição PBS-Tween. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras branco fortificadas, utilizadas na validação do kit de ELISA.

Em seguida, 50 µL de cada solução padrão ou amostras e amostras branco fortificadas diluídas foram transferidos para as cavidades da placa de ELISA. Após adição do conjugado e do anticorpo diluídos, foi realizada incubação (1 hora), seguida de três lavagens da placa com tampão de lavagem PBS-Tween - reagente contido no kit - e adição do substrato cromógeno. A leitura (450 nm) foi realizada após a segunda incubação, que ocorreu na ausência de luz (15 minutos), e adição da solução para interromper a reação.

Análise de amostras por LC-APCI-MS/MS QToF

As amostras que apresentaram resultados não conformes no teste de ELISA foram submetidas à análise confirmatória por LC-APCI-MS/MS QToF, através do método descrito por Oliveira et al (2009).

O preparo de amostras foi realizado utilizando uma alíquota de 2 mL de leite (A2), ou de amostra branco fortificada com os analitos nas concentrações correspondentes às das respectivas curvas analíticas (50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) com o padrão interno mantido na concentração de 2,5 mg kg^{-1} . A essa alíquota, que foi transferida para tubos de centrifuga, foi adicionado 0,4 mL de solução de TCA 10%. Os tubos foram agitados em vortex por 3 minutos e submetidos à centrifugação durante 10 minutos a 3600 g. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μm e uma alíquota de 20 μL foi utilizada para análise.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna C_{18} XTerra MS (150 x 2,1 mm, 5 μm – Waters, USA), com gradiente de fase móvel (Tabela 1), constituída de HFBA 10 mmol L^{-1} em água e em acetonitrila.

Tabela 1. Gradiente de eluição para análise de STP e DHSTP.

Tempo (min)	Fluxo (mL min^{-1})	%HFBA 10 mmol L^{-1} em Água	% HFBA 10 mmol L^{-1} em ACN
0	0,2	75	25
3	0,2	75	25
10	0,2	64	36
15	0,2	75	25

Para ionização dos analitos no método de quantificação, a intensidade de corrente da agulha corona foi mantida em 0,5 μA ; a voltagem do cone de amostra em 50 V e do cone de extração em 2 V; a temperatura da probe em 650 $^{\circ}\text{C}$ e a de dessolvatação em 150 $^{\circ}\text{C}$; a energia do íon foi mantida em 2 V e a energia de colisão em 7 V; o fluxo de gás do cone foi igual a 0 (zero) L h^{-1} e do gás de dessolvatação foi igual a 100 L h^{-1} . Para confirmação da identidade dos analitos, foram utilizadas as mesmas condições de ionização definidas para quantificação,

com exceção das energias de colisão, que foram iguais a 28 V para STP e 25 V para DHSTP. Os íons para confirmação da identidade de STP são os fragmentos de m/z iguais a 263,1 e 407,2, além do íon molecular de m/z igual a 582,3. Para DHSTP os íons de confirmação são os de m/z iguais a 263,1 e 409,2 e o íon molecular de m/z igual a 584,3 (OLIVEIRA et al, 2009).

Validação Analítica

A validação analítica dos métodos foi realizada de acordo com as recomendações das principais agências regulatórias internacionais como a Comunidade Européia (CE, 2002) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC (THOMPSON et al, 2002). Os parâmetros seletividade, curva analítica, linearidade, precisão (repetibilidade intra e inter-dias), exatidão, limites de detecção e de quantificação foram avaliados através do uso de amostras branco e amostras branco fortificadas em diferentes níveis de concentração, conforme descrito a seguir.

Para a elaboração das curvas analíticas e a determinação da linearidade do método para cada analito, foram utilizadas amostras fortificadas em seis níveis de concentração. A seletividade do método por LC-MS/MS foi avaliada através da análise de amostras branco, monitorando a presença de interferentes da matriz que pudessem comprometer a capacidade de identificação e/ou de quantificação dos analitos.

Avaliou-se a precisão em duas etapas: (i) repetibilidade intra-dia: avaliando o desvio relativo dos resultados de análises em quatro replicatas (n=4), em um mesmo dia, realizadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento; e (ii) repetibilidade inter-dias: observando variações entre análises realizadas em três dias diferentes (n=3), pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento. Para isso, foram preparadas amostras fortificadas com cada analito, nos níveis de 100, 200 e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A exatidão foi avaliada através de testes de recuperação realizados mediante análise de amostras fortificadas com cada analito, nos mesmos níveis utilizados na verificação da precisão. Os resultados obtidos foram transformados em porcentagem da quantidade conhecida dos analitos, utilizadas na fortificação das amostras.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados através da análise de amostras fortificadas em níveis decrescentes de concentração dos analitos, avaliando a exatidão e precisão dos resultados. O limite de detecção (LOD) para cada analito foi igual a mínima concentração detectável pelo método em amostra fortificada. O limite de quantificação (LOQ) foi igual a mínima concentração dos analitos, presentes na amostra fortificada, que pôde ser quantificada pelo método analítico com exatidão e precisão adequadas (ANVISA, 2003b). Para o método de ELISA, foram considerados aceitáveis os valores sugeridos por Findlay et al (2000) para métodos de traigem. Para o método por LC-MS/MS, foram aceitos os valores estabelecidos pela Comunidade Européia (2002).

Análise dos resultados

Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagem em relação à absorbância máxima, referente à solução padrão zero ($0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Essa solução apresenta máxima absorbância devido à característica dos imunoenaios competitivos indiretos, em que a intensidade da cor formada na etapa final de análise é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra (STEAD, 2000). Todos os valores de porcentagem de absorbância obtidos para as soluções padrão, amostras fortificadas e amostras reais foram analisados através do modelo de regressão não-linear do tipo função logística de quatro parâmetros (4PL), utilizando o software *GraphPad Prism*[®] (USA).

Os imunoenaios apresentam curvas analíticas inerentemente não lineares, e possuem características intrínsecas que tornam a seleção do modelo para a

curva analítica mais elaborada em relação aos métodos cromatográficos. O modelo 4PL fornece uma representação precisa da relação sigmoidal entre a resposta analítica e o logaritmo da concentração observada para muitos imunoensaios, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos a partir da curva analítica (FINDLAY et al, 2000).

Modelo 4PL

$$Y = A + \frac{(D - A)}{1 + 10^{\log^{(C-X)-B}}}$$

Em que Y é a resposta esperada; X, a concentração; A, a resposta na concentração mínima; D, a resposta na concentração máxima; C, a concentração na metade da resposta entre A e D (EC₅₀); B, o parâmetro de inclinação.

Os resultados obtidos por LC-APCI-MS/MS QToF foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados através do software *Quanlinx*[®] (Micromass – UK).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do kit de ELISA

O ajuste do modelo foi verificado através do cálculo dos erros relativos médios (% R.E.) entre as concentrações das soluções padrão e os valores previstos pelo modelo para cada nível da curva analítica (Tabela 2), que foram todos menores que 10% (FINDLAY et al, 2000).

Tabela 2. Valores de erro médio relativo (% R.E.) entre os níveis de concentração das soluções padrão e os valores previstos pelo modelo.

Nível de Concentração	Erro Médio Relativo (%)
0,5	-1,629
1,5	1,542
4,5	0,130
13,5	-1,242
40,5	0,445

O método analítico apresentou correlação adequada, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99, para ambos os analitos, na faixa linear de 50 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Os resultados obtidos nos ensaios para determinação da precisão estão de acordo com os valores recomendados para imunoensaios (FINDLAY et al, 2000), com exceção da repetibilidade inter-dias na concentração igual a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que apresentou desvio padrão relativo superior a 20% (Tabela 3). Entretanto, a inadequada precisão inter-dias não é um inconveniente para testes como ELISA, em que são preparadas curvas analíticas em cada lote de análise.

Os valores de recuperação do método variaram entre 118,2 e 146,7% para STP e entre 69,2 e 103,6% para DHSTP (Tabela 3), com valores calculados de erros médios relativos maiores que aqueles recomendados para imunoensaios (FINDLAY et al, 2000), indicando inadequada exatidão do método. Esses resultados mostraram que, embora não apresente exatidão, o método é mais adequado para a determinação de resíduos de STP do que DHSTP em leite, pois fornece valores superestimados, enquanto na análise de DHSTP, os valores calculados são inferiores. Contudo, a exatidão não é um parâmetro fundamental para testes de triagem, desde que todas as amostras com resultados não conformes sejam analisadas por um método confirmatório (GAUDIN et al, 2005).

Tabela 3. Resultados de exatidão e precisão obtidos nos ensaios de repetibilidade intra e inter-dias para STP e DHSTP em leite por ELISA.

Concentração de STP e DHSTP	Exatidão (Recuperação, %)		Precisão (CV, %)	
	STP	DHSTP	STP	DHSTP
Repetibilidade intra-dia				
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	118,2	71,3	6,5	5,9
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	146,7	69,2	13,1	6,6
300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4)	131,2	103,6	5,4	3,5
Repetibilidade inter-dias (3 dias)				
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	129,6	78,6	11,1	22,9
200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	146,5	76,9	9,1	16,6
300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3)	123,1	102,5	10,4	9,6

CV: Coeficiente de Variação ou Desvio Padrão Relativo.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram inferiores ao LMR definido para STP e DHSTP em leite ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$), com valores iguais a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para ambos os analitos.

Validação do método por LC-APCI-MS/MS QToF

O método por LC-APCI-MS/MS QToF apresentou linearidade adequada, com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para ambos os analitos na faixa linear de 50 a $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão do método foi comprovada através dos valores de desvio padrão relativo para os ensaios de repetibilidade intra e inter-dias, inferiores a 15% para níveis de concentração acima de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e inferiores a 20% para níveis abaixo desse valor, o que está de acordo com as recomendações da Comunidade Européia (2002). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os analitos foram iguais a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método apresentou exatidão com valores na faixa de 84 a 110%.

Análise das amostras por ELISA

A concentração de resíduos de STP e DHSTP nas amostras foi determinada a partir da equação de regressão não linear, modelo 4PL, obtidas a partir das curvas analíticas preparadas em soluções padrão fornecidas com o kit (Figura 4). Para correção do valor calculado, os valores de concentração, obtidos na forma de $\log(X)$, foram transformados, através da função 10^X e multiplicados pelo fator de diluição, igual a 20.

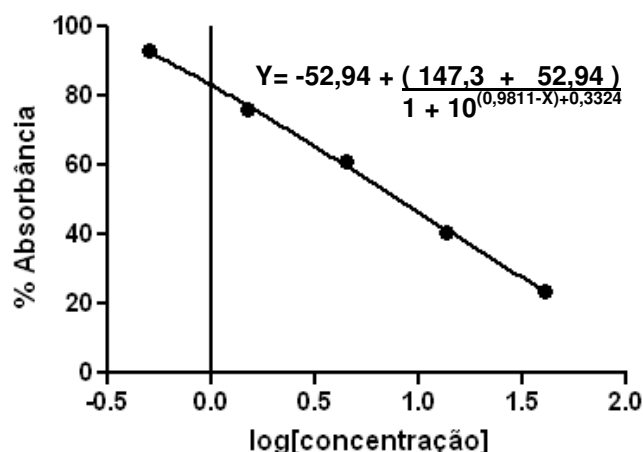


Figura 3. Curva analítica preparada em solução padrão para cálculo da concentração dos resíduos de STP e DHSTP em leite. $r=0,9995$.

Das 299 amostras analisadas, somente duas apresentaram resultados não conformes, sendo ambas de leite integral, de marcas diferentes, adquiridas na cidade de Campinas. Essas amostras foram, então, submetidas à análise pelo método confirmatório empregando LC-MS/MS.

Análise de amostras por LC-APCI-MS/MS QToF

A análise confirmatória por LC-APCI-MS/MS QToF foi realizada para as duas amostras com resultados não conforme obtidas através do teste de ELISA.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) é uma técnica reconhecidamente de alta seletividade, podendo ser empregada para a determinação dos aminoglicosídeos em alimentos, pois possibilita a quantificação e confirmação de identidade em baixos níveis de concentração. Além disso, a habilidade do analisador de massas do tipo tempo de voo (ToF) prover resultados de alta exatidão, o torna um instrumento de grande importância para compor métodos confirmatórios de análise dentro do contexto legislativo, como o da Comunidade Européia (CE, 2002).

As duas amostras diagnosticadas previamente como não conformes pelo teste ELISA, apresentaram resultados negativos para a presença dos fragmentos de confirmação da identidade de STP e DHSTP na análise pelo método confirmatório, indicando que ambas as amostras não continham esses analitos.

Os métodos analíticos que se baseiam em imunoensaios são suscetíveis à interferências por componentes da matriz, visto que, em geral, são realizados na ausência de procedimentos de extração. Geralmente, a diluição com tampão contendo agentes quelantes (Tween-20, Triton X-100, EDTA) é empregada para minimizar esses efeitos (CHARD, 1987; FINDLAY et al, 2000). A ocorrência de reações cruzadas foi evidenciada neste trabalho através dos resultados contraditórios obtidos no imunoensaio e no método confirmatório. Esses resultados corroboram a necessidade de confirmação dos resultados positivos obtidos nos imunoensaios, utilizando métodos que apresentem maior seletividade.

CONCLUSÕES

O método de ELISA apresentou correlação adequada, com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para ambos os analitos na faixa linear de 50 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão do método foi comprovada através dos valores de desvio relativo para os ensaios de repetibilidade intra e inter-dias, que estão de acordo com as recomendações para imunoensaios (FINDLAY et al, 2000), com exceção da repetibilidade inter-dias na concentração igual a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que foi maior que 20%. Os valores de recuperação e erro relativo médio indicaram que embora não apresente exatidão, o método é mais adequado para a determinação de resíduos de STP do que DHSTP em leite, pois fornece valores superestimados, enquanto na análise de DHSTP, os valores calculados são inferiores aos valores reais.

O método confirmatório (LC-MS/MS) apresentou linearidade adequada na faixa linear de 50 a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão e exatidão do método foram comprovadas de acordo com valores de desvio relativo e recuperação dentro dos limites recomendados pela Comunidade Européia (2002).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos validados foram iguais a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para ambos os analitos.

Os resultados dos procedimentos de validação dos métodos de ELISA e LC-MS/MS demonstraram que estes são adequados para as análises de triagem e confirmatória, respectivamente, de resíduos de STP e DHSTP em leite pasteurizado, em níveis de concentração inferiores ao LMR estabelecido para essas substâncias ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Na análise das amostras de leite pasteurizado, coletadas na região de Campinas, SP, não foram encontrados resíduos de STP ou DHSTP em níveis detectáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet, Brasília, 2003a. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, 2003b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- BACCARO, M.R., MORENO, A.M., CORRÊA, A., FERREIRA, A.J.P., CALDERARO, F.F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. Arquivos do Instituto Biológico, v.69, n.2, p.15-18, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Portaria Nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2631>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. 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. Portaria Nº 527, de 15 de agosto de 1995. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16313>. Acesso em 1 de setembro de 2008.
- CHARD, T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques, In: R.H. Burdon, van Knippenberg (Eds.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 6, Part 2, third ed., Elsevier, New York, 1987, pp. 175–193.
- CODEX ALIMENTARIUS. Resíduos de Medicamentos Veterinários en los Alimentos, v.3, 2ª ed. 1993.
- CODEX ALIMENTARIUS. Veterinary Drug Residues in Food Maximum Residue Limits. 2006. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/VetDrugServlet?Substances=323&Items=501&Tissues=9&out_style=by+substance&Domain=VetDrugMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fvetdrugs%2Fvetd_q-e.htm. Acesso em 22 de Julho de 2009.

- COMUNIDADE EUROPÉIA - Decisão da Comissão 657/2002. Jornal Oficial da Comunidade Européia L221/8, 2002.
- COSTA, E.O., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., SILVA, J.A.B., GARINO JÚNIOR, F., BENITES, N.R., HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. *Napgama*, v.2, p.16-20, 1999a.
- EMBRAPA GADO DE LEITE. Classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca – 2007. Atualização em 2008. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br/>. Acesso em 3 de junho de 2009.
- EUROPEAN COMMUNITY - COMMISSION REGULATION (EEC) 2377/90. Official Journal of European Community. L224, n.1, 1990.
- FINDLAY, J. W. A., SMITH, W. C., LEE, J. W., NORDBLOM, G. D., DAS, I., DESILVA, B. S., KHAN, M. N., BOWSHER, R. R. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.21, n.6, p.1249-1273, 2000.
- GAUDIN, V., CADIEU, N., SANDERS, P. Results of a European proficiency test for the detection of streptomycin/dihydrostreptomycin, gentamicin and neomycin in milk by ELISA and biosensor methods. *Analytica Chimica Acta*, v.529, n.1-2, 24, p.273-283, 2005.
- HORIE, M., SAITO, H., NATORI, T., NAGATA, J., NAKAZAWA, H. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v.27, n.5, p.863-874, 2004.
- MARTINS JÚNIOR, H.A., BUSTILLOS, O.V., PIRES, M.A.F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (LC-MS/MS). *Química Nova*, v.29, n.3, p.586-592, 2006.
- MERCOSUL – MERCADO COMUM DO CONE SUL. Metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Resolução 54/2000, [s.n.l.], 2000.
- NUÑES, B.S.M., CAÑON, H., IRAGÜEN, D., ESPINOSA, S., LILLO, J. Depletion study of trimethoprim and sulphadiazine in milk and its relationship with mastitis pathogenic bacteria strains minimum inhibitory concentrations (MICs) in dairy cows. 001. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.24, p.83-88, 2001.
- OLIVEIRA, R.C., PASCHOAL, J.A.R., SISMOTTO, M., AIROLDI, F.P., REYES, F.G.R. Development and Validation of an LC-APCI-MS/MS QToF Analytical Method for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk. *Journal of Chromatographic Science*, 2009. *In press*.

- RIBEIRO, A.R., KELLERMANN, A., SANTOS, L.R., FITTÉL, A.P., NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.3, p.357-360, 2006.
- SAMANIDOU, V.F., EVAGGELOPOULOU, E.N. Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *Journal of Separation Science*, v.30, p.2549 - 2569, 2007.
- STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.747, n.1-2, p.69-93, 2000.
- STELLA, A.E., RIGOBELLO, E.C., OLIVEIRA, A.C., MALUTA, R.P., MARIN, J.M., ÁVILA, F.A. Ocorrência e sensibilidade microbiana de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de propriedades leiteiras na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, p.66-74, 2008.
- THOMPSON, M., STEPHEN, L. R., WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, v.74, p.835, 2002.

CONCLUSÃO GERAL

O uso de antimicrobianos na medicina veterinária pode levar a presença de resíduos desses medicamentos no leite bovino, apresentando riscos à saúde humana. A estreptomicina e diidroestreptomicina, pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, são antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento da mastite e, quando presentes em níveis residuais nos alimentos, como o leite, podem representar riscos à saúde dos consumidores, como ototoxicidade e nefrotoxicidade, além de reações alérgicas e desenvolvimento de resistência bacteriana. Para avaliar a presença de resíduos de aminoglicosídeos em leite é necessário que métodos analíticos de triagem ou confirmatórios, que apresentam adequado desempenho, estejam disponíveis.

O método de ELISA apresentou correlação adequada, com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para ambos os analitos na faixa linear de 50 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão do método foi comprovada através dos valores de desvio relativo para os ensaios de repetibilidade intra-dia, que estão de acordo com as recomendações para imunoensaios. Os valores de recuperação e erro relativo médio indicaram que embora não apresente exatidão, o método é mais adequado para a determinação de resíduos de STP do que DHSTP em leite, pois fornece valores superestimados, enquanto na análise de DHSTP, os valores calculados são inferiores aos valores reais.

Foi desenvolvido um método para a análise confirmatória de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite utilizando LC-APCI-MS/MS QToF, com procedimento simples de preparo de amostras, o que foi importante para a obtenção de uma análise mais rápida e menos suscetível a perdas dos analitos, resultando em adequada eficiência de extração. O método apresentou linearidade adequada, com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para ambos os analitos na faixa linear de 50 a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A precisão e exatidão do método foram comprovadas através dos valores obtidos de desvio relativo e recuperação, respectivamente, que estão de acordo com as recomendações da Comunidade Européia. Para a

proposta de confirmação das identidades dos analitos, o método permitiu o monitoramento de dois íons fragmentos além do íon molecular, o que supre as recomendações da Comunidade Européia (2002) para essa finalidade.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos métodos validados foram iguais a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para ambos os analitos.

Os resultados dos procedimentos de validação dos métodos de ELISA e LC-MS/MS demonstraram que estes são adequados para as análises de triagem e confirmatória, respectivamente, de resíduos de STP e DHSTP em leite pasteurizado, em níveis de concentração inferiores ao LMR estabelecido para essas substâncias ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Na análise das amostras de leite pasteurizado, coletadas na região de Campinas, SP, não foi verificada a presença de resíduos de STP ou DHSTP em níveis detectáveis.

ANEXO

TRABALHO APRESENTADO EM EVENTO CIENTÍFICO

XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas
Relacionadas. Florianópolis, 27 a 30 de Outubro de 2008.

Desenvolvimento e validação de método analítico quantitativo para determinação de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite pasteurizado por LC-APCI-MS/MS QToF micro.

Renata Cabrera de Oliveira; Felix Guillermo Reyes Reyes; Jonas Augusto Rizzato Paschoal; Marcela Sismoto e Flávia Pereira da Silva Airoidi.

Para o controle de resíduos medicamentos veterinários em alimentos é necessário desenvolver métodos analíticos que apresentem seletividade e detectabilidade adequadas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico quantitativo para a determinação de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem*, com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS/MS QToF Micro). A validação analítica foi realizada de acordo com as principais agências regulatórias internacionais (Comunidade Européia e IUPAC) determinando faixa linear, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidades intra e inter-dias), seletividade, limites de detecção e quantificação e limite de decisão e capacidade de detecção. O preparo de amostra envolveu desproteínização do leite com ácido tricloroacético, seguida de análise por LC-APCI-MS/MS QToF. A separação cromatográfica foi realizada com coluna analítica C₁₈ X-Terra MS, 150 x 2,1 mm, 5 µm, a 30°C, utilizando como fase móvel o ácido heptafluorobutírico 10 mM em água e em acetonitrila, com eluição por gradiente. A análise quantitativa dos analitos foi realizada através do monitoramento dos íons precursores [M-H]⁺ dos analitos, estreptomicina e diidroestreptomicina, com m/z iguais a 582,3 e 584,3, respectivamente e [M-Na]⁺ do padrão interno, tobramicina, com m/z igual a 490,1. O método apresentou linearidade adequada, com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para ambos os analitos na faixa linear de 50 a 400 µg kg⁻¹, e exatidão com valores médios entre 84 e 110%. A precisão do método foi comprovada através dos valores de desvio relativo para os ensaios de repetibilidade intra e inter-dias, que foram menores que 15% para níveis de concentração acima de 100 µg mL⁻¹ e menores que 20% para níveis abaixo desse valor. Os limites de detecção (LOD) e

quantificação (LOQ) foram iguais a $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para ambos os analitos. O limite de decisão (CC_α) foi igual a 212 e $207 \mu\text{g kg}^{-1}$ para estreptomicina e diidroestreptomicina, respectivamente, enquanto os valores de capacidade de detecção (CC_β) foram iguais a 224 e $213 \mu\text{g kg}^{-1}$. A seletividade do método analítico foi verificada pela ausência de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos ou do padrão interno. Os resultados indicam que o método é qualificado para a determinação de resíduos dos analitos em níveis de concentração inferiores ao LMR estabelecido ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Agradecimentos: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CAPES.



Desenvolvimento e Validação de Método Analítico Quantitativo para Determinação de Resíduos de Estreptomicina e Diidroestreptomicina em Leite Pasteurizado por LC-APCI/MS/MS QToF Micro®.



Renata Cabrera de Oliveira; Jonas Augusto Rizzato Paschoal; Marcela Sismotto e Flávia Pereira da Silva Airoidi; Felix Guillermo Reyes Reyes.

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. e-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br

INTRODUÇÃO

A presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos constitui riscos à saúde do consumidor, como hipersensibilidade e resistência bacteriana, além de causar prejuízos econômicos devido à alterações na produção de derivados. Para o controle desses resíduos é necessário desenvolver métodos analíticos que apresentem seletividade e detectabilidade adequadas.

OBJETIVO

Desenvolver e validar um método analítico quantitativo e de confirmação de identidade de resíduos de estreptomicina (STP) e diidroestreptomicina (DHSTP) em leite utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI/MS/MS QToF Micro®).

MATERIAL E MÉTODOS

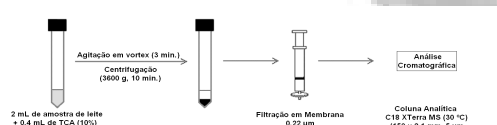


Figura 1. Procedimento de preparo de amostras para análise de STP e DHSTP em leite pasteurizado.

Tabela 1. Gradiente de Eluição para Análise de STP e DHSTP.

Tempo (min)	Fluxo (mL min ⁻¹)	HFBA 10 mmol L ⁻¹ em água (%)	HFBA 10 mmol L ⁻¹ em ACN (%)
0	0,2	75	25
3	0,2	75	25
10	0,2	64	36
15	0,2	75	25

Tabela 2. Condições de Ionização para Identificação e Quantificação de STP e DHSTP.

Condições de Ionização	Quantificação	Identificação
Fonte de Ionização	APCI, Positivo	APCI, Positivo
Intensidade de corrente da agulha corona (µA)	0,5 µA	0,5 µA
Voltagem do cone de amostra (V)	50 V	50 V
Voltagem do cone de extração (V)	2 V	2 V
Temperatura da probe (°C)	650 °C	650 °C
Temperatura de dessolvatação (°C)	150 °C	150 °C
Energia do íon (V)	2	2
Gás do cone (L h ⁻¹)	0	0
Gás de dessolvatação (L h ⁻¹)	100	100
	STP	DHSTP
Energia de colisão (V)	7	25

RESULTADOS

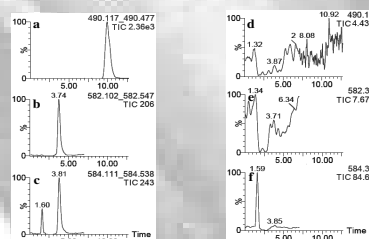


Figura 2. Cromatogramas obtidos com monitoramento dos íons de m/z iguais a 490,1 (a, d), 582,3 (b, e) e 584,3 (c, f) de amostra branco fortificada com STP 200 µg kg⁻¹, DHSTP 200 µg kg⁻¹ e TOB 2,5 mg kg⁻¹ (a, b, c); e cromatogramas de amostra branco (d, e, f).

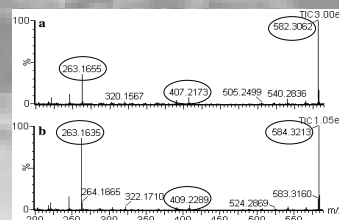


Figura 3. Espectros de fragmentação de STP (a) e DHSTP (b), obtidos por LC-APCI-MS/MS QToF, com os analitos diluídos em solução padrão.

Tabela 3. Parâmetros de validação do método analítico

Parâmetros Analíticos	STP	DHSTP
Íon de Quantificação (m/z)	582,3	584,3
Íons de Identificação (m/z)	263,1, 407,2 e 582,3	263,1, 409,2 e 584,3
Faixa linear (µg kg ⁻¹)	50 – 400	50 – 400
Linearidade (r)	> 0,99	> 0,99
Intra-dia (CV, %)		
50 µg kg ⁻¹ (n=4)	7,0	10,9
100 µg kg ⁻¹ (n=4)	5,5	8,3
200 µg kg ⁻¹ (n=4)	8,4	8,0
Precisão Inter-dias (CV, %)		
50 µg kg ⁻¹ (n=3)	12,7	15,5
100 µg kg ⁻¹ (n=3)	9,9	11,8
200 µg kg ⁻¹ (n=3)	3,7	10,6
50 µg kg ⁻¹ (n=4)	96,8	100,6
100 µg kg ⁻¹ (n=4)	104,1	102,1
200 µg kg ⁻¹ (n=4)	106,8	104,7
LOD (µg kg ⁻¹)	25	25
LOQ (µg kg ⁻¹ , n=4)	50	50
Efeito Matriz (%)	25	21
Eficiência de Extração (%)	71-104	78-107

C.V.: Coeficiente de Variação

CONCLUSÃO

O procedimento de preparo de amostras desenvolvido é simples e apresentou adequada eficiência de extração.

A seletividade do método analítico foi verificada pela ausência de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos e do padrão interno em amostra branco.

O método apresentou linearidade adequada, com coeficiente de correlação (r) maior que 0,99 para ambos os analitos na faixa linear de 50 a 400 µg kg⁻¹.

A precisão foi avaliada através de ensaios de repetibilidade intra e inter-dias. A exatidão foi medida por testes de recuperação. Ambos os parâmetros apresentaram resultados adequados conforme as recomendações da Comunidade Européia (Directiva 200/657/CE).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os analitos foram iguais a 25 µg kg⁻¹ e 50 µg kg⁻¹, respectivamente.

Para a confirmação da identidade dos analitos, o método permitiu o monitoramento de dois íons fragmentos além do íon molecular.

Os resultados do procedimento de validação demonstraram que o método é adequado para a quantificação e a confirmação de identidade de resíduos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite pasteurizado, em níveis de concentração inferiores ao LMR estabelecido para essas substâncias (200 µg kg⁻¹).

AGRADECIMENTOS

- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Figura 1. Pôster apresentado no XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. Florianópolis, 27 a 30 de Outubro de 2008.