



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE E FÁRMACOS
USANDO A CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
ELETROFORESE CAPILAR**

TESE DE DOUTORADO

AUTORA : MÓNICA CECILIA VARGAS MAMANI

ORIENTADORA : PROFA. Dra. SUSANNE RATH

CAMPINAS

Março 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M31d

Mamani, Mónica Cecilia Vargas.
Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientadora: Susanne Rath.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. HPLC. 2. Eletroforese capilar. 3. Leite.
4. Antimicrobianos. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development and validation of methods for determination of antibiotics in milk and drugs using high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.

Palavras-chaves em inglês: HPLC, Capillary electrophoresis, Milk, Antibiotics.

Área de concentração: Química Analítica.

Titulação: Doutor em Ciências.

Banca examinadora: Prof. Dra. Susanne Rath (orientadora), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-Unicamp), Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-Unicamp), Prof. Dr. Fabio Augusto (IQ-Unicamp), Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares (IQ-USP-SP), Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado (FEA-Unicamp).

Data de defesa: 30/03/2007

“Muitos são os planos no coração do homem, mas o que prevalece é o propósito do Senhor”

Provérbios 19:21

Dedico este trabalho em memória do meu Pai.

Dedico este trabalho também a minha amada mãe Benigna e meus amados irmãos David, Jenny, Oscar, Ruth e meu sobrinho Diego, pelo amor e estímulos dados durante minha vida até aqui.

Amo vocês!...

AGRADECIMENTOS

A meu amado e Todo-poderoso Deus, que me deu a oportunidade de fazer minha Pós-graduação no Brasil. Pelo cuidado, força e coragem para alcançar as metas.

A minha grande amiga e orientadora Dra. Susanne Rath pela amizade, apoio e interesse com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química, aos professores e funcionários pelas oportunidades e facilidades concedidas à realização deste trabalho.

Ao Professor Felix Reyes pela amizade e sugestões valiosas desta tese.

Ao Professor Jaime Amaya, pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho, Jamil, Eduardo, Jonas, Leandro, Ricardo, Socorro, Gabriella, Paula, Francielle, Larissa, Keity e Lucia pela agradável convivência e pela amizade durante todo este tempo.

A minha querida família aqui no Brasil, minha tia Laura, Mark, Jim, Eliane, André, Felipe, Dona Lurdes e Don José. A toda minha família no Peru, pelo seu constante apoio e estímulo para continuar com os meus objetivos.

Aos meus queridos amigos, Julian, Carmen, Patricia, Marcelli, Maria, Pascual, Hilda, Carlos, Loer, Ausberta, Jorge, Justo, Tonhy, Richard, Mário e toda minha gente peruana pela amizade e apoio. A minha família da casa Babel, Tim, Joyce, Márcia, Henderson, Natalia, Silvana, Rodrigo, Elmer, Juliana, Michelle. Pelas reuniões e orações, graças a Deus por isso.

Ao Pastor Antônio pelos seus sábios conselhos e apoio em todo momento. A todos meus irmãos em Cristo, em especial a Márcio, Pati, Andréa, Mara, Márcia e María Izabel pela amizade, amor e ajuda na minha caminhada espiritual.

A todas as pessoas que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

Formação Acadêmica

- ❖ Doutorado em Química Analítica –UNICAMP.
Título da tese: “Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida e alta eficiência e eletroforese capilar”
Período: março 2003 a março 2007.
- ❖ Mestrado em Química Analítica – UNICAMP.
Título da tese: “Avaliação da presença de metais em plantas medicinais por fluorescência de raios-X e voltametria de redissolução anódica”
Período: julho 2001 a fevereiro 2003.
- ❖ Bacharelado em Farmácia y Bioquímica, concluído em 1997, na Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Peru.
Numero de colégio Farmacêutico Peruano: 5913

Artigos em revista científica indexada

- ❖ Mónica C. Vargas Mamani, Mônica F. Abreu, Susanne Rath, Luiz M. Aleixo. “Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, p. 709-713, 2005.
- ❖ Mónica C. Vargas Mamani, Susanne Rath, Jaime Amaya Farfán, Felix Reyes. “Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design”. *Talanta*, v. 70, n. 2, p.236-243, 2006.
- ❖ Mónica C. Vargas Mamani, Susanne Rath, Jaime Amaya Farfán, Felix Reyes. “Analytical method for simultaneous determination of chloramphenicol, fluoroquinolones and sulfonamides in pharmaceuticals by CZE using experimental design”. *Journal of Chromatography A* (em fase de revisão).
- ❖ Mónica C. Vargas Mamani, Felix Reyes, Susanne Rath. Simultaneous determination of multiple tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol residues in pasteurized milk for HPLC with ultraviolet detection. *Analytica Chimica Acta* (em fase de revisão).

Apresentações de trabalhos em eventos científicos

- ❖ 2º Simpósio Brasileiro de Cromatografia Técnicas Afins (SIMCRO 2006). Água de São Pedro, São Pedro, Brasil, 18-20 outubro, 2006.
Mónica M. Vargas, Susanne Rath, Jaime Amaya Farfán, Felix G. R. Reyes.
A method for simultaneous determination of chloramphenicol and fluoroquinolones in pharmaceuticals by CZE using experimental design.
- ❖ 5th International Congress of Pharmaceutical Science. CIFARP 2005. Riberão Preto, Brazil, september 25-28, 2005.
Mónica M. Vargas, Susanne Rath, Gustavo Tayar, Jaime Amaya Farfán, Felix G. R. Reyes.
“Method development and validation for the determination of tetracyclines by capillary electrophoresis”.

- ❖ 13º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA). 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica (CIAQA). Niterói, RJ, Brasil, 12-16 setembro 2005.
Mônica M. Vargas, Jaime Amaya Farfán, Felix G. R. Reyes, Susanne Rath.
“Planejamento experimental na separação de antimicrobianos por eletroforese capilar” (apresentação oral).
- ❖ 28º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. SBQ. Poços de Caldas, 30 de maio a 2 de junho de 2005.
Eduardo Winter, Lúcia Codognoto, Mônica M. Vargas, Paulo C. F. L. Gomes, Fábio P. Vieira, Gabriel B. Monteiro, Susanne Rath.
“Aplicação de cela eletroquímica em fluxo como detector amperométrico na determinação de cloranfenicol por HPLC”
- ❖ 10 Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins. COLACRO X. Campos de Jordão, Brasil, 18-22 outubro, 2004.
Mônica M. Vargas, Jaime Amaya Farfán, Felix G. R. Reyes, Susanne Rath.
“Planejamento experimental para a separação de tetraciclinas por eletroforese capilar”.
- ❖ XXVI Congresso Latinoamericano de Química. 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. SBQ. Salvador, 30 de maio a 2 de junho de 2004.
Mônica M. Vargas, Gustavo Tayar, Jaime Amaya Farfán, Felix G. R. Reyes, Susanne Rath.
“CLAE versus Eletroforese Capilar na separação de Tetraciclinas”
- ❖ XIII RAU (Reunião anual do usuário da LNLS) Fevereiro 2003
Eder J. Franco, Luiz C.M. Pataca, Mônica M. Vargas, Carlos A. Perez, Maria I.M.S. Bueno, Susanne Rath.
“Determinação de metais em plantas medicinais destinadas a produção de fitoterápicos por fluorescência de raios-x com luz síncrotron (SYXRF)”.
- ❖ XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Centro de Eventos do Pantanal - Cuiabá-MT (19 a 22/11/2002).
* Mônica M. Vargas, Mônica F. Abreu, Susanne Rath, Luiz M. Aleixo. “Determinação simultânea de cádmio e chumbo em plantas medicinais por voltametria de redissolução anódica”.
* Eder J. Franco, Luiz C.M. Pataca, Mônica M. Vargas, Marilí V.N. Rodrigues, Rodnei A. F. Rodrigues, Vera Lúcia G. Rehder, Pedro M. Magalhães, Mônica F. Abreu, Carlos A. Perez, Maria I.M.S. Bueno, Susanne Rath.
“Avaliação da presença de metais em plantas medicinais por fluorescência de raios-x com luz síncrotron (SYXRF)”.

Experiências Profissionais

- ❖ HOSPITAL CENTRO MÉDICO NAVAL “Cirujano Mayor Santiago Távora”. junho 1996- maio 1997, Lima- Peru. (Estágio)
- ❖ LABORATÓRIOS FARMINDÚSTRIA, outubro 1997 a abril 1998, Lima- Peru. (Estágio)
- ❖ LABORATÓRIOS LANSIER S.A.C. Julho 1998- agosto 1999, Lima- Peru.
- ❖ LABORATÓRIOS M&G VIDA NATURAL. Outubro 1999 a maio 2001, Lima- Peru.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO ANTIMICROBIANOS EM LEITE E FÁRMACOS USANDO HPLC E ELETROFORESE CAPILAR

Antimicrobianos são largamente empregados na medicina veterinária e resíduos destes podem permanecer nos alimentos de origem animal, acima de valores considerados seguros, quando não são respeitadas as boas práticas veterinárias. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol e fluoroquinolonas em fármacos usando a eletroforese capilar (CE), assim como método multiresíduos para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, sulfametoxazol, sulfametazina, sulfaquinoxalina e cloranfenicol em leite usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os métodos por CE, com detector de arranjo de diodos (DAD), foram otimizados usando planejamento experimental, sendo estabelecidas as seguintes condições para as tetraciclina: eletrólito, carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10; voltagem, 13 kV; e temperatura, 23°C. Para as sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol as condições ótimas para separação foram: eletrólito hidrogenofosfato de sódio 60 mmol L⁻¹ + tetraborato sódico 20 mmol L⁻¹, pH 8,5; voltagem, 24 kV e temperatura, 26 °C. A determinação dos antimicrobianos no leite foi realizada por HPLC-DAD usando coluna C₁₈ híbrida e fase móvel composta de uma fase aquosa (FA): tampão acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, cloreto de cálcio 0,035 mol L⁻¹ e EDTA sódico 0,025 mol L⁻¹, pH 7 e fase orgânica (FO): metanol:acetonitrila, 75:25v/v, com gradiente de eluição. O preparo de amostra consistiu na precipitação das proteínas seguida de extração em fase sólida. Os métodos foram validados e aplicados para análise de amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C.

Palavras chaves: antimicrobianos, HPLC, eletroforese capilar, validação, leite e fármacos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN MILK AND DRUGS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Antimicrobial agents are widely employed in veterinary medicine and residues can remain in food of animal origin above their safe level, when good veterinary practices are not respected. The aim of this work was to develop and validate methods using capillary electrophoresis for the determination of tetracycline, sulphonamides, chloramphenicol and fluoroquinolones in drugs, as well as establishing a multiresidue determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, sulphamethazine, sulphaquinoxaline, sulphamethoxazole and chloramphenicol in milk using high performance liquid chromatography (HPLC). The CE methods, with a photodiode array detector (DAD), were optimized using experimental design, with the following conditions been established for the separation of tetracyclines: electrolyte, 50 mmol L⁻¹ sodium carbonate + 1 mmol L⁻¹ of EDTA, pH 10; voltage, 13 kV voltage and temperature, 23°C. For sulphamethazine, sulphaquinoxaline, sulphamethoxazole, danofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin and chloramphenicol the optimum conditions were: electrolyte 60 mmol L⁻¹ sodium phosphate + 20 mmol L⁻¹ sodium tetraborate, pH 8.5; voltage 24 kV and temperature, 26 °C. The determination of antimicrobials in milk was carried through by HPLC-DAD using a C₁₈ hybrid column and a mobile phase composed of 0.075 mol L⁻¹ sodium acetate, 0.035 mol L⁻¹ calcium chloride and 0.025 mol L⁻¹ sodium EDTA, pH 7 (aqueous phase) and methanol:acetonitrile, 75:25 v/v (organic phase), with gradient elution. The sample preparation consisted in protein precipitation followed by solid phase extraction. The methods were validated and used for the analysis of pasteurize milk samples of type A, B and C.

Keywords: antibiotics, HPLC, capillary electrophoresis, validation, milk and drugs.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxix
CAPITULO I - INTRODUÇÃO	01
I.1 PRODUÇÃO DO LEITE	03
I.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE	05
I.3 IMPORTÂNCIA DO LEITE NA NUTRIÇÃO HUMANA	06
I.4 ANTIMICROBIANOS	06
I.5 ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO ANIMAL	11
I.6 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE	12
I.7 ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO	13
I.8 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS	17
I.8.1 ENSAIOS QUALITATIVOS (TRIAGEM) PARA RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS	18
I.8.2 MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS	21
I.8.2.1 PREPARO DE AMOSTRA	23
CAPITULO II - OBJETIVOS	
II.1 OBJETIVOS GERAIS	31
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33

CAPITULO III	35
Desenvolvimento de métodos para a determinação de antimicrobianos em fármacos, usando a CE	
III.1 INTRODUÇÃO	37
III.2 OBJETIVOS	38
III.3 EXPERIMENTAL	38
III.3.1 EQUIPAMENTOS	38
III.3.2 CAPILAR ELETROFORÉTICO	39
III.3.3 REAGENTES	39
III.3.4 PADRÕES ANALÍTICOS	39
III.3.5 PREPARO DE PADRÕES E SOLUÇÕES	41
III.4 PROCEDIMENTOS	41
III.4.1 CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS INICIAIS NA SEPARAÇÃO DE SMX, SMZ, SQX, CLF, OTC, TC, CTC, DANO, CIPRO E ENRO	41
III.4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS	42
III.4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS, FLUOROQUINOLONAS, SULFONAMIDAS E CLORANFENICOL EM FÁRMACOS POR ELETROFORESE CAPILAR	45
III.4.4 PROCEDIMENTO DA FARMACOPÉIA AMERICANA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS POR HPLC	49
III.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
III.5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ELETROFORÉTICO	49
III.5.1.1 ESTUDOS PRELIMINARES DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA SEPARAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS	71
III.5.1.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA A SEPARAÇÃO DAS TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS, FLUOROQUINOLONAS E CLORANFENICOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	79
III.5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS, FLUOROQUINOLONAS, SULFONAMIDAS E CLORANFENICOL EM FÁRMACOS	99
III.6 CONCLUSÃO	99

CAPITULO IV	101
Desenvolvimento de método para a determinação de multiresíduos de antimicrobianos em leite, usando a HPLC	
IV.1 INTRODUÇÃO	103
IV.2 OBJETIVOS	104
IV.3 EXPERIMENTAL	104
IV.3.1 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	104
IV.3.2 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	105
IV.3.3 CARTUCHOS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	105
IV.3.4 REAGENTES E SOLUÇÕES	105
IV.3.5 PADRÕES ANALÍTICOS	106
IV.3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E FASE MÓVEL	106
IV.3.7 PROCEDIMENTOS	107
IV.3.7.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS INICIAIS NA SEPARAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC	107
IV.3.7.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	107
IV.3.7.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE	109
IV.3.7.3.1 PREPARO DE AMOSTRA DE LEITE	109
IV.3.7.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE	112
IV.3.7.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE	116
IV.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
IV.4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	117
IV.4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE	132
IV.4.2.1 PREPARO DE AMOSTRA DE LEITE	132
IV.4.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE	139
IV.4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO	154

IV.5 CONCLUSÕES	156
	159
CAPITULO V.- CONCLUSÕES	
	165
CAPITULO VI.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	
	179
ANEXOS	

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela I.1 Classificação mundial dos principais países produtores de leite – 2004.	4
Tabela I.2 Consumo recomendado de leite no Brasil de acordo com a faixa etária.	6
Tabela I.3. Limites máximos de resíduos (LMR) para antimicrobianos em leite fixado pelo Codex Alimentarius, MAA, FDA e EC.	16
Tabela I.4. Exemplos de kits de triagem para resíduos de antimicrobianos.	20
Tabela I.5a-g Preparo de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.	24
Tabela III.1 Valores nominais correspondentes a –1, 0, +1, -1,68 e 1,68 no planejamento experimental 2^3 na avaliação da robustez do método para o grupo A .	45
Tabela III.2 Valores nominais correspondentes a –1, 0, +1, -1,68 e 1,68 no planejamento experimental 2^3 na avaliação da robustez do método para o grupo B .	45
Tabela III.3 Estudo univariado do eletrólito na separação dos antimicrobianos TC, OTC, CTC, DXC, CLF, DANO, CIPRO, ENRO, AMOX, AMP, PEN, SMX, SMZ, SQX.	61
Tabela III.4 Valores teóricos dos pKa dos antimicrobianos	65
Tabela III.5 Equilíbrios de dissociação e mobilidades efetivas dos antimicrobianos em estudo.	68
Tabela III.6 Mobilidades eletroforéticas para os antimicrobianos.	69
Tabela III.7 Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}_{IV} para a separação dos antimicrobianos do grupo A por CE. Eletrólito: carbonato de sódio + EDTA 1 mmol L ⁻¹ .	72
Tabela III.8 Planejamento experimental 2^3 composto central, para a separação dos antimicrobianos do grupo A por CE. Eletrólito: carbonato de sódio + EDTA 1 mmol L ⁻¹ . Voltagem 13 kV.	72

Tabela III.9	Planejamento experimental 2 ³ composto central para a separação dos antimicrobianos do grupo B por CE. Eletrólito: fosfato/borato 20 mmol L ⁻¹ + EDTA 1 mmol L ⁻¹ . Voltagem 24 kV.	74
Tabela III.10	Parâmetros de conformidade de sistema dos métodos de CE e HPLC, para o grupo A.	80
Tabela III.11	Parâmetros de conformidade de sistema dos métodos de CE e HPLC, para o grupo B.	82
Tabela III.12	Parâmetros de validação para TC e CTC, OTC e DXC.	90
Tabela III.13	Parâmetros de validação para CLF, CIPRO, ENRO, SMZ e SMX. DANO padrão interno para CIPRO e ENRO e SQX padrão interno para SMZ e SMX.	91
Tabela III.14	Resultados da análise de amostras comerciais a base de tetraciclina (cápsulas 500 mg) por CE e HPLC.	92
Tabela III.15	Resultados da análise de amostras comerciais a base de cloranfenicol (solução oftálmica 4 mg mL ⁻¹) por CE e HPLC.	92
Tabela III.16	Resultados da análise de amostras comerciais a base de CIPRO (comprimidos 500 mg) e ENRO (solução injetável 50 mg mL ⁻¹) por CE e HPLC.	93
Tabela III.17	Resultados da análise de amostras comerciais a base de SMX (comprimidos 400 mg e suspensão oral 40 mg mL ⁻¹) por CE e HPLC.	93
Tabela IV.1	Procedimentos de preparos de amostra de leite.	110
Tabela IV.2	Procedimentos experimentais empregados na etapa de extração em fase sólida.	112
Tabela IV.3	Gradientes de eluição empregados para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, MC e CTC. Fase estacionária C ₁₈ sílica.	119
Tabela IV.4	Influência do pH da fase móvel no tempo de retenção dos antimicrobianos na coluna C ₁₈ sílica.	120
Tabela IV.5	Valores teóricos dos pKa dos antimicrobianos.	122
Tabela IV.6	Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico.	132

Tabela IV.7 Estudo de eficiência de extração (%) do leite fortificado com SMX, SQX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL ⁻¹) em coluna C ₁₈ , com SPE e LLE + SPE	135
Tabela IV.8 Média da eficiência de extração média (%) de amostras de leite fortificadas com os antimicrobianos (0,10 µg mL ⁻¹), n=2.	137
Tabela IV.9 Eficiências de extração para SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC, ENRO e CLF em diferentes estudos de eluição, usando cartucho OASIS HLB.	139
Tabela IV.10 Parâmetros de validação para SMX, SQX, SMZ e CLF em leite.	150
Tabela IV.11 Recuperações (%) de SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC de amostras branco fortificadas em diferentes níveis de concentração e análise em diferentes dias.	153
Tabela IV.12 Amostras de leite tipos A, B e C coletadas no comércio de Campinas.	155
Tabela IV.13 Análise de leite pasteurizado dos tipos A, B e C quanto à presença de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC e CLF.	156

Lista de Figuras

	Pág.
Figura I.1 Produção mundial de leite de vaca – 1995/2004.	3
Figura I.2 Produção total de leite no Brasil, 1998 – 2003.	4
Figura I.3 Estrutura química dos beta-lactâmicos.	7
Figura I.4 Estrutura química das tetraciclinas.	8
Figura I.5 Estrutura química das sulfonamidas.	9
Figura I.6 Estrutura química das fluoroquinolonas.	10
Figura I.7 Estrutura química do cloranfenicol.	11
Figura III.1 Mobilidade dos analitos segundo as cargas e massas.	50
Figura III.2 Eletroferogramas de AMP, AMOX e PEN 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em diferentes temperaturas.	52
Figura III.3 Eletroferogramas de AMP, AMOX, CIPRO, ENRO, CLF, TC, OTX, CTC, DXC, utilizando eletrólito fosfato 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.	54
Figura III.4 Eletroferogramas de DANO, CIPRO, ENRO, CLF, TC, OTC, CTC, DXC, AMP, AMOX e PEN, utilizando eletrólito borato 100 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.	55
Figura III.5 Eletroferogramas de DANO, CIPRO, CLF, TC, OTC, CTC, DXC, AMP, AMOX, PEN, SMZ e SQX, utilizando eletrólito tris 100 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 11.	56
Figura III.6 Eletroferogramas de DANO, CIPRO, ENRO, CLF, TC, OTC, CTC, DXC, SMZ, SQX, AMP, AMOX e PEN, utilizando eletrólito carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 11.	57
Figura III.7 Eletroferogramas de DANO, CIPRO, ENRO, CLF, TC, OTC, CTC, DXC, AMP, AMOX e PEN, utilizando eletrólito fosfato/borato 20/100 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.	58
Figura III.8 Eletroferogramas de AMP, AMOX, PEN, DANO, CIPRO, ENRO, CLF, TC, OTC, CTC, DXC, SMZ, SQX e SMX, utilizando eletrólito fosfato/borato 100/20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.	59

Figura III.9 Espectros UV-Vis dos analitos em estudo.	60
Figura III.10 Equilíbrios ácido - base para as tetraciclinas.	66
Figura III.11 Equilíbrios ácido - base para as fluoroquinolonas.	67
Figura III.12 Equilíbrio ácido - base para as sulfonamidas.	67
Figura III.13 Equilíbrio ácido - base para cloranfenicol.	67
Figura III.14 Mobilidades eletroforéticas ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) das tetraciclinas, obtidas em função do pH do eletrólito.	70
Figura III.15 Mobilidades eletroforéticas das fluoroquinolonas, cloranfenicol e sulfonamidas, obtidas em função do pH do eletrólito.	70
Figura III.16 Superfície de resposta da concentração do eletrólito carbonato + EDTA 1 mmol L^{-1} versus pH, obtida do planejamento fatorial 2^3 para a separação dos picos dos antimicrobianos grupo A. Considerando as variáveis concentração do eletrólito, temperatura e pH.	73
Figura III.17 Superfície de resposta da temperatura versus concentração do eletrólito carbonato + EDTA 1 mmol L^{-1} , obtida do planejamento fatorial 2^3 para a separação dos picos dos antimicrobianos grupo A. Considerando as variáveis concentração do eletrólito, temperatura e pH.	73
Figura III.18 Superfície de resposta da voltagem (kV) versus temperatura ($^{\circ}\text{C}$) obtida do planejamento fatorial 2^2 para a separação dos picos dos antimicrobianos do grupo B.	75
Figura III.19 Gráfico do efeito Joule para o eletrólito carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} , pH 10, para a determinação das tetraciclinas.	76
Figura III.20 Gráfico do efeito Joule para o eletrólito fosfato 60 mmol L^{-1} / borato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura 26°C , para a determinação dos antimicrobianos do grupo B.	76
Figura III.21 Eletroferogramas de uma mistura de: 1.TC (t_r 6.9 min), 2.CTC (t_r 7,2 min), 3.OTC (t_r 7,5 min) e 4.DXC (t_r 7,7 min). Concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L^{-1} + EDTA 1	77

mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, 13 kV de voltagem (sulfonamidas) e 270 nm (fluoroquinolonas e cloranfenicol).

- Figura III.22** Eletroferogramas de uma mistura de: 1.CLF, 2.DANO, 3.CIPRO, 78
4.ENRO, 5.SMZ 6.SQX e 7.SMX. (t_{m1} 7,2 min, t_{m2} 7,4 min, t_{m3} 7,7
min, t_{m4} 8,3 min, t_{m5} 9,8 min, t_{m6} 10,7 min, t_{m7} 11,86 min,
respectivamente). Concentração de 100 µg mL⁻¹.
- Figura III.23** Estudo da degradação de CLF, DANO, CIPRO, ENRO, SMZ, 83
SQX, TC, CTC, OTC e DXC, expressos em recuperação (%).
- Figura III.24** Condições de estresse para o CTC com H₂O₂ 3% 83
- Figura III.25** Curvas analíticas dos antimicrobianos do grupo A: TC, CTC, OTC 85
e DXC.
- Figura III.26** Curvas analíticas dos antimicrobianos do grupo B: CLF, SMZ, 86
SMX, CIPRO, e ENRO.
- Figura III.27** Gráficos de resíduos para TC, CTC, OTC e DXC. 88
- Figura III.28** Gráficos de resíduos para CIPRO, ENRO, CLF, SMX e SMZ. 89
- Figura III.29** Respostas de superfície de contorno para TC, CTC, OTC e DXC, 95
usado para avaliar o estudo de robustez no planejamento
experimental 2³.
- Figura III.30** Respostas de superfície de contorno para DANO, CIPRO e 96
ENRO, usada para avaliar o estudo de robustez no planejamento
experimental 2³.
- Figura III.31** Respostas de superfície de contorno para SQX, SMX, SMZ e 97
CLF, usada para avaliar o estudo de robustez no planejamento
experimental 2³.
- Figura IV.1** Procedimento de extração dos antimicrobianos em leite. 116
- Figura IV.2** Cromatogramas da separação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, 121
CTC e CLF, (500 ng mL⁻¹) em diferentes pH. A: pH 7,3 e B: pH 6,5.
- Figura IV.3** Cromatogramas da separação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, 123
CTC, MC e CLF, (500 ng mL⁻¹) com FE: C₁₈.
- Figura IV.4** Cromatograma do estudo da fase móvel orgânica 65:35 v/v de 124

MeOH:ACN na separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CLF e CTC. Com tempos de retenção de t_r 11,1; 13,2; 17,3; 20,9; 20,9; 24,9; 26,8 e 27,9 min, respectivamente, 1000 ng mL⁻¹.

Figura IV.5 Cromatograma do estudo da fase móvel orgânica 80:20 v/v de MeOH:ACN na separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CLF e CTC. 125

Figura IV.6 Cromatograma do estudo da fase móvel orgânica 75:25 v/v de MeOH:ACN na separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CLF e CTC. 126

Figura IV.7 Cromatograma do estudo da fase móvel com fosfato de sódio 0,010 mol L⁻¹ + EDTA 0,025 mol L⁻¹, 75:25 v/v de MeOH:ACN, pH 7. 127

Figura IV.8 Espectros de cloranfenicol, tetraciclina e sulfonamidas determinados por HPLC com detector de arranjo de diodos. 129

Figura IV.9 Cromatograma característico para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, CTC e MC (PI), 1000 ng mL⁻¹; λ : 250 nm. 130

Figura IV.10 Cromatograma característico para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, CTC e MC (PI); 1000 ng mL⁻¹. λ : 278 nm. 130

Figura IV.11 Cromatograma característico para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, CTC e MC (PI); 1000 ng mL⁻¹. λ : 385 nm. 131

Figura IV.12 Cromatograma obtido para amostra branco e amostra branco fortificada com SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CTC e CLF, após LLE-LT. Solvente extrator ACN. 134

Figura IV.13 Cromatograma característico para amostra branco e amostra fortificada com SMX, SMX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL⁻¹) no preparo de amostra LLE + SPE. FE: C₁₈. 135

Figura IV.14 Cromatograma característico para amostra branco e a amostra fortificada com SMX, SMX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL⁻¹), utilizando cartucho C₁₈ no preparo de amostra LLE + SPE. FE: C₁₈. 136

Figura IV.15 Cromatograma característico para amostra branco e amostra fortificada com SMX, SMX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL⁻¹), 136

- utilizando cartucho C_{18} no preparo de amostra LLE + SPE. FE: C_{18} .
- Figura IV.16** Estudo da estabilidade do leite fortificado, estocado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. (S: 140 semana).
- Figura IV.17** Estudo da degradação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC e 142 CLF, expressa como recuperação (%).
- Figura IV.18** Cromatogramas da amostra branco e amostra branco fortificada 143 com 100 ng mL^{-1} de SMX, SMX, SMZ, CLF, OTC, TC, CTC e ENRO (300 ng mL^{-1}), utilizando cartucho polimérico (OASIS HLB) no preparo de amostra por SPE. FE: C_{18} híbrida.
- Figura IV.19** Cromatogramas da amostra branco e amostra branco fortificada 144 com 100 ng mL^{-1} de SMX, SMZ, CLF, OTC, TC, CTC e ENRO (300 ng mL^{-1}), utilizando cartucho polimérico (OASIS HLB) no preparo de amostra por SPE. FE: C_{18} híbrida.
- Figura IV.20** Cromatogramas da amostra branco e amostra branco fortificada 145 com 100 ng mL^{-1} de SMX, SMZ, CLF, OTC, TC, CTC e ENRO (300 ng mL^{-1}), utilizando cartucho polimérico (OASIS HLB) no preparo de amostra por SPE.
- Figura IV.21** Curvas analíticas usando padrão interno para o grupo das A) 147 sulfonamidas, B) tetraciclínas e C) cloranfenicol. O padrão interno utilizado foi a ENRO.
- Figura IV.22** Gráficos de resíduos para SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e 149 CTC.

Lista de abreviaturas

ACN:	Acetonitrila
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCA:	Ácido tricloroacético
C ₁₈ :	Coluna com fase estacionaria octadecil
CE:	Eletroforese capilar (“capillary electrophoresis”)
CIPRO:	Ciprofloxacina
CLF:	Cloranfenicol
CTC:	Clortetraciclina
DAD:	Detector de arranjo de fotodiodos
DANO:	Danofloxacina
DMC:	Demeclociclina
DXC:	Doxiciclina
EC:	Comunidade Européia
ENRO:	Enrofloxacina
FAO:	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
EOF:	Fluxo eletrosmótico
FDA:	Food and Drug Administration
FE:	Fase estacionária
FM:	Fase móvel
HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência (“high performance liquid chromatography”)
IDA:	Ingestão Diária Aceitável
IDF:	International Dairy Federation
MAA:	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil
MARBO:	Marbofloxacina
MeOH:	Metanol
MC:	Minociclina
MiC:	Teste de inibição microbiana
MTC:	Metaciclina

NFX:	Norfloxacina
LMR:	Limite máximo de resíduo
LMPR:	Limite mínimo de performance requerida
LLE:	Extração líquido-líquido
LLE-LT:	Extração líquido-líquido a baixa temperatura
LOD:	Limite de detecção
LOQ:	Limite de quantificação
OTC:	Oxitetraciclina
RSD:	Desvio padrão relativo
SARA:	Sarafloxacina
SQX:	Sulfaquinoxalina
SMZ:	Sulfametazina
SMX:	Sulfametoxazol
SPE:	Extração em fase sólida (“solid phase extraction”)
TBA:	Tetrabutylamônio
TC:	Tetraciclina
USP:	United States Pharmacopeia
UV-VIS:	Ultravioleta-Visível
WHO:	Organização Mundial da Saúde (“World Health Organization”)

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

I.1. PRODUÇÃO DO LEITE

O leite é um alimento básico de consumo mundial e a sua produção vem apresentando um aumento contínuo segundo os dados estatísticos reportados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 1999), como foi reportado pela EMBRAPA. De 1995 até 2004 houve um aumento na produção de leite de 42,3% no continente asiático, 41,5% na Oceania e 19,9% no continente Americano. No entanto, na Europa e na África houve, no mesmo período, um decréscimo na produção de 5,7% e 5%, respectivamente, conforme dados estatísticos emitidos pela FAO (Figura I.1) (EMBRAPA 1, 2005).

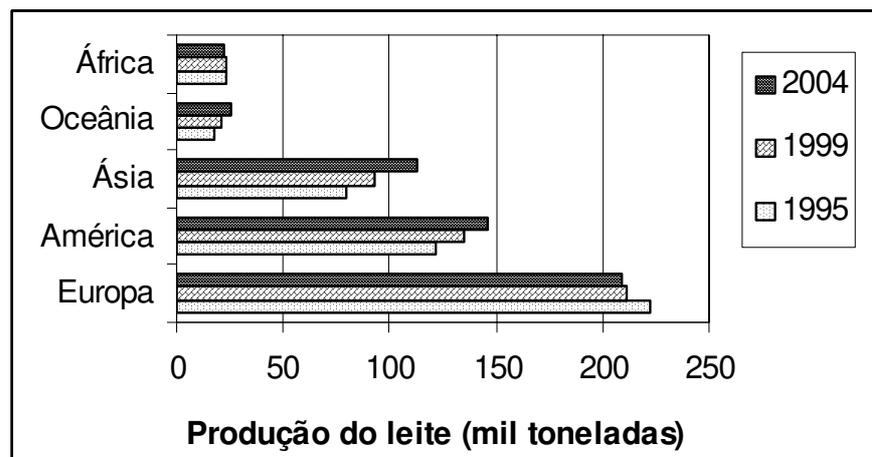


Figura I.1 Produção mundial de leite de vaca – 1995/2004. (EMBRAPA 1, 2005).

Na classificação mundial de produtos de leite, o Brasil ocupa o sexto lugar. Os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar, tendo produzido no ano de 2004, 77,57 bilhões de litros de leite (EMBRAPA 2, 2005). A Tabela I.1 mostra os valores de produção de leite para os quinze maiores produtores mundiais de leite.

A produção total de leite de vacas ordenhadas no Brasil tem incrementado em 20,87% de 1998 até 2003, segundo as informações da EMBRAPA (Pesquisa de Pecuária Municipal e Pesquisa Trimestral do Leite), conforme apresentado na Figura I.2. O aumento médio por ano foi de aproximadamente 3,8%.

Tabela I.1 Classificação mundial dos principais países produtores de leite– 2004 (EMBRAPA 2, 2005).

	Pais	Produção de Leite (bilhões de litros) 2004	Percentual total
1°	Estados Unidos	77,565	15,0
2°	Índia	37,800	7,3
3°	Rússia	30,850	6,0
4°	Alemanha	28,000	5,4
5°	França	24,200	4,7
6°	Brasil	23,320	4,5
7°	Nova Zelândia	14,780	2,9
8°	Reino Unido	14,600	2,8
9°	Ucrânia	13,700	2,7
10°	Polônia	12,400	2,4
11°	Itália	10,730	2,1
12°	Holanda	10,700	2,1
13°	Austrália	10,377	2,0
14°	México	9,950	1,9
15°	Argentina	8,100	1,6
	Outros países	188,765	36,6
	TOTAL	515,837	100,0

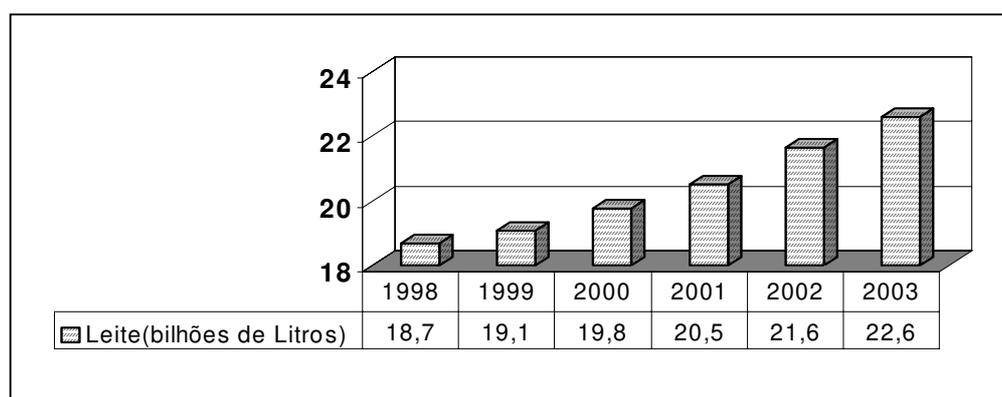


Figura I.2 Produção total de leite no Brasil, 1998 – 2003 (EMBRAPA 2, 2005).

I.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

Sabor e odor: O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor *sui generis* pouco pronunciado, essencialmente devido à relação entre lactose e cloretos, apresentando-se como doce e salgado, não ácido e não amargo, podendo ser afetado em condições como a ocorrência de mastite (infecções do úbere). Sabores e odores pronunciados em leite fresco devem-se usualmente à alimentação (ração, silagem) e ao ambiente de ordenha.

Cor: A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz. A cor amarelada provém do pigmento caroteno, que é lipossolúvel. Cores anormais podem resultar de desenvolvimento microbiano, como a cor vermelha causada pela bactéria *Serratia marcescens* e a cor azul, pela bactéria do gênero *Pseudomonas*.

Acidez: O leite logo após a ordenha, apresenta reação ácida com a fenolftaleína, mesmo sem que nenhuma acidez, como ácido láctico, tenha sido produzida por fermentações. A acidez do leite fresco deve-se à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos.

A acidez natural do leite varia entre 0,13 e 0,17 %, expressa como ácido láctico. A elevação da acidez é determinada pela transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a acidez desenvolvida do leite. Para o leite proveniente de diversas fontes, depois de misturado, o pH varia entre 6,6 e 6,8.

Densidade: A densidade do leite varia entre 1,023 g/mL e 1,040 g/mL a 15 °C; o valor médio é de 1,032 g/mL. O leite com alto teor de gordura apresenta maior densidade em relação ao leite com baixo teor de gordura, em razão do aumento do extrato seco desengordurado que acompanha a aumento no teor de gordura. (QUÍMICA NOVA ESCOLA, 1997).

I.3 IMPORTÂNCIA DO LEITE NA NUTRIÇÃO HUMANA

O leite tem sido um alimento de grande importância para o homem desde a domesticação de animais e o começo da agricultura. Também é o alimento de origem animal mais versátil, sendo utilizado na dieta de várias formas diferentes. É o primeiro alimento que ingerem os mamíferos recém-nascidos, incluindo os bebês, e na maioria dos casos continua sendo o único componente de sua dieta durante um considerável período de tempo. O Ministério de Saúde do Brasil recomenda o consumo de leite para todas as faixas etárias, segundo apresentado na Tabela I.2. Dados do Ministério de Saúde demonstram que o brasileiro deveria consumir, em média, 200 litros de leite por ano, seja na forma fluida ou na de produtos lácteos. No entanto, o consumo médio no País, é cerca de apenas 120 litros por habitante (anualmente), como é reportado pela Embrapa Gado de Leite (EMBRAPA 3).

Tabela I.2 Consumo recomendado de leite no Brasil de acordo com a faixa etária.

Faixas de idades	Recomendação
Crianças (até 10 anos)	400 mL dia ⁻¹ (146 L ano ⁻¹)
Adolescentes (11-19 anos)	700 mL dia ⁻¹ (256 L ano ⁻¹)
Adultos (maiores de 20 anos)	600 mL dia ⁻¹ (219 L ano ⁻¹)

Fonte: Ministério de Saúde do Brasil (EMBRAPA 3).

I.4 ANTIMICROBIANOS

Uma larga variedade de antimicrobianos estão disponíveis para uso na medicina veterinária, entre esses, os antimicrobianos das classes dos beta-lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, antibióticos peptídeos e ionóforos. Entre os antimicrobianos proibidos destaca-se o cloranfenicol, por causa da toxicidade potencial para os seres humanos suscetíveis, e os nitrofuranos, por causa de sua característica mutagênica e carcinogênica de seus resíduos (O'KEEFFE & KENNEDY, 1998).

Nosso trabalho foi focado nos antimicrobianos dos grupos dos beta-lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas e cloranfenicol, cujas estruturas estão apresentadas a seguir.

A estrutura básica de algumas penicilinas está ilustrada na Figura I.3, a qual consiste num anel tiazolidínico ligado a um anel beta-lactâmico ao qual está ligada uma cadeia lateral R. A cadeia lateral é responsável pelas características antibacterianas e farmacológicas destes compostos (GOODMAN & GILMAN, 1990). Os antimicrobianos beta-lactâmicos são amplamente usados na medicina veterinária. Tem-se verificado que resíduos destes antibióticos nos alimentos podem causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Esses antimicrobianos são administrados na ração animal, tanto para fins terapêuticos como profiláticos (KENNEDY e cols., 1998).

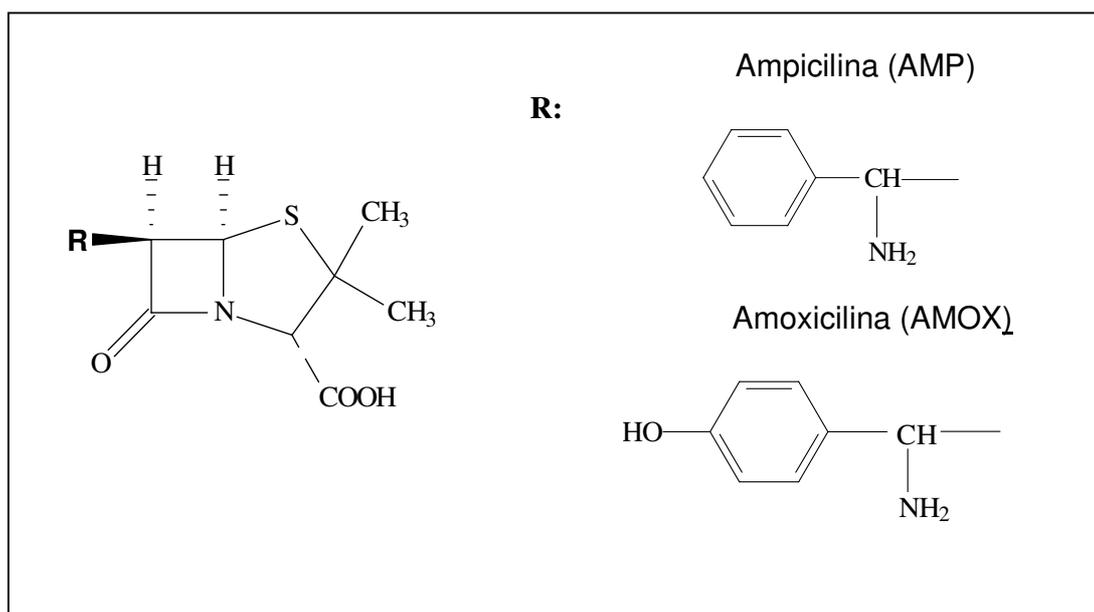


Figura I.3 Estruturas químicas dos beta-lactâmicos.

As tetraciclina constituem um grande grupo de antibióticos com estrutura básica e atividades comuns. Enquanto a clortetraciclina (CTC) e a oxitetraciclina (OTC) são sintetizadas pelo *Streptomyces aureofaciens* e *Streptomyces rimosus*, respectivamente, a tetraciclina (TC) é um antibiótico semi-sintético, produzido a partir da clortetraciclina. A doxiciclina (DXC) e minociclina (MC) são também derivados

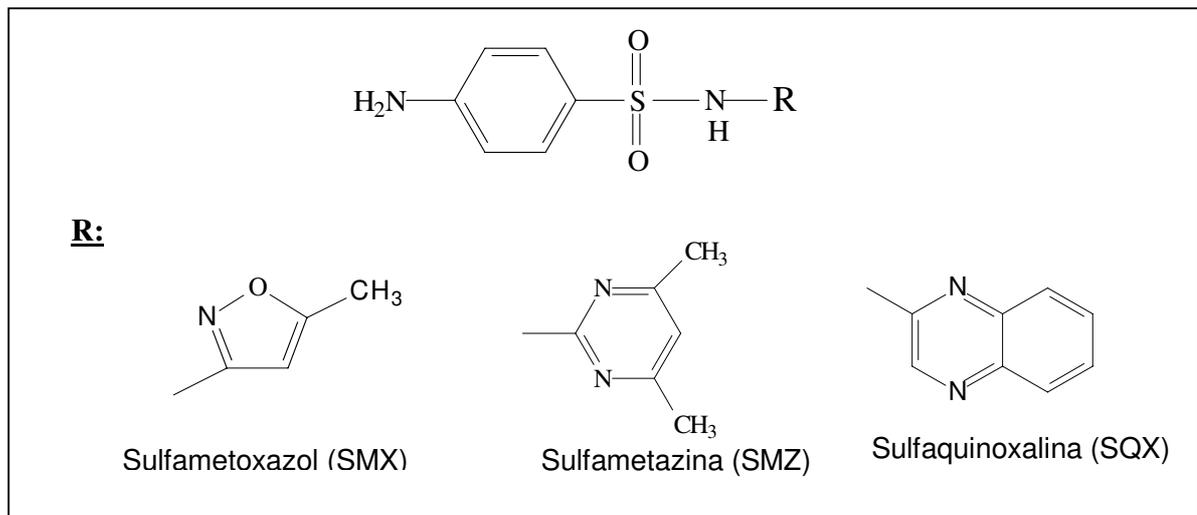


Figura I.5 Estruturas químicas das sulfonamidas.

As fluoroquinolonas (Figura I.6) são antimicrobianos sintéticos de segunda geração, derivadas das quinolonas, contendo um átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinila na posição 7, os quais são responsáveis por uma maior atividade antibacteriana e menor toxicidade do que as quinolonas de primeira geração (POSYNIAK e cols., 1999). As fluoroquinolonas têm uma ampla faixa de atividade antibacteriana e seu uso tem sido incrementado na medicina veterinária pela grande efetividade em tratamentos de infecções bacterianas. De fato, essas substâncias têm sido usadas satisfatoriamente no tratamento em infecções causadas por microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos e micoplasmas, em infecções pulmonares, urinárias e digestivas. Estes componentes atuam principalmente inibindo a DNA-girase bacteriana. Os resíduos destes antimicrobianos em animais podem ser encontrados no leite e tecidos (CINQUINA, 2003b).

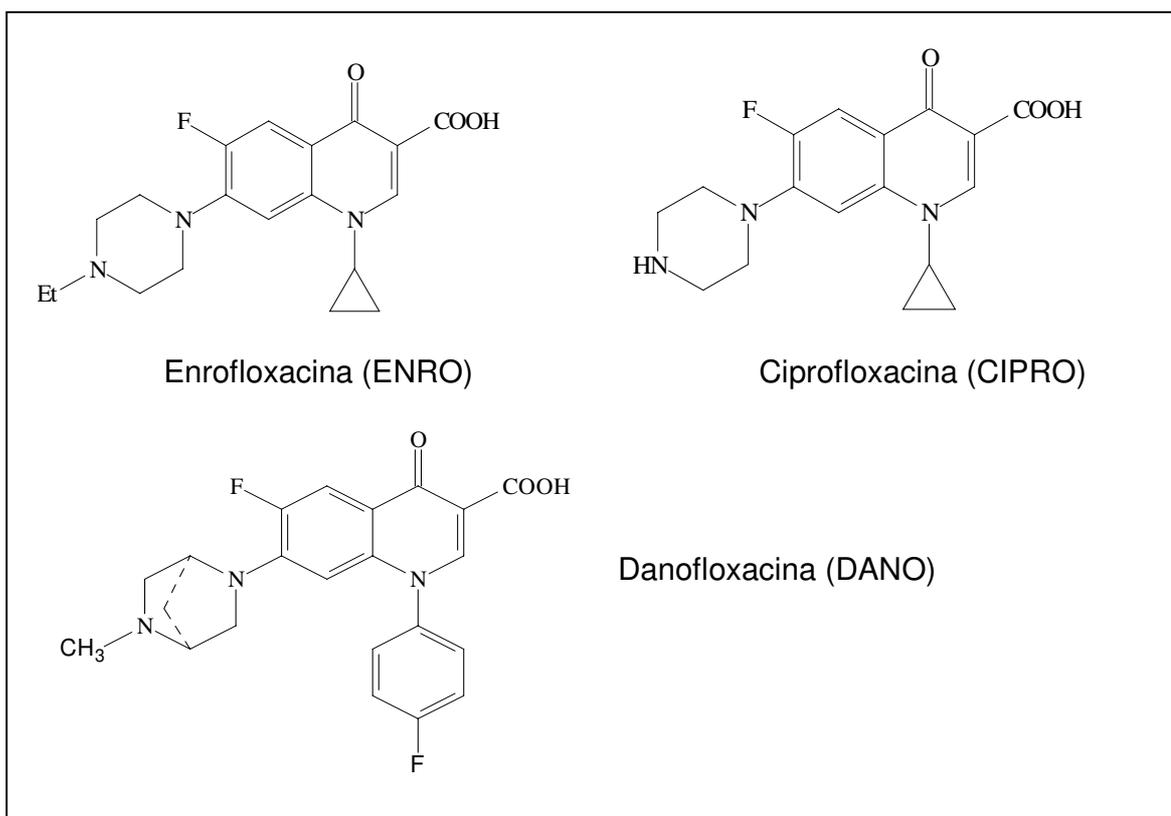


Figura I.6 Estruturas químicas das fluoroquinolonas.

O cloranfenicol (Figura I.7) é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces venezuelae*, um microorganismo isolado pela primeira vez de uma amostra de solo colhida na Venezuela, em 1947. Depois de determinada a estrutura relativamente simples do material cristalino, o antimicrobiano foi preparado sinteticamente. A forma biologicamente ativa é a levorrotatória. O cloranfenicol inibe a síntese de proteínas em bactérias e, em menor grau, em células eucarióticas. A droga penetra rapidamente nas células bacterianas, muito provavelmente por um processo de difusão facilitada. O cloranfenicol atua primariamente através de uma ligação reversível à sub-unidade ribossômica 50 S. O cloranfenicol também pode inibir a síntese mitocondrial de proteínas nas células de mamíferos, uma vez que os ribossomos mitocondriais se assemelham mais aos ribossomos bacterianos do que aos ribossomos citoplasmáticos 80 S das células de mamíferos. Nos mamíferos, as células eritropoéticas parecem ser particularmente sensíveis ao composto (GOODMAN & GILMAN, 1990).

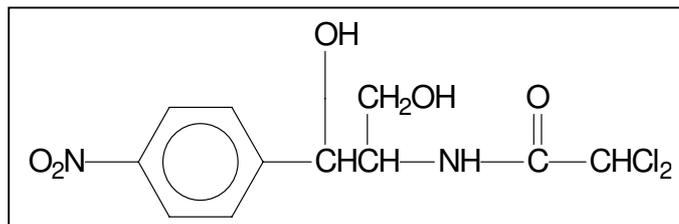


Figura I.7 Estrutura química do cloranfenicol (CLF).

I.5. ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, sendo utilizados na produção animal para (i) tratar enfermidades (terapêutico), (ii) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático) e (iii) melhorar a taxa de crescimento ou conversão alimentar (promotores de crescimento) (ANADÓN & MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, (1999).

O uso de antimicrobianos pelos produtores e médicos veterinários no tratamento de doenças infecciosas de vacas leiteiras, principalmente mastites, e a utilização de medicamentos na alimentação animal como suplemento de dietas, têm contribuído para a presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Outras fontes de resíduos de antimicrobianos no leite são a higienização de equipamentos e utensílios da indústria ou adição proposital dessas substâncias para encobrir a deficiência na qualidade higiênica do leite e assim aumentar o tempo de vida útil, como é reportado por BORGES e cols. (2000).

A mastite é uma doença importante do ponto de vista econômico, pois causa prejuízos enormes. As infecções no úbere podem reduzir a produção de leite de 10% a 12% na mesma lactação. Se a infecção ocorrer no período seco, a perda pode chegar a 40% do potencial na lactação seguinte. O controle da mastite não só tem importância para o produtor e para a indústria de laticínios devido às grandes perdas econômicas, como também para o consumidor, pois ocorre perda da qualidade nutritiva e higiênica do leite (LANGONI e cols., 2000).

Os antimicrobianos comumente usados na produção animal, administrados via ração, incluem as seguintes classes de substâncias: beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinoxalinas, sulfamídeos e quinolonas.

PODHORNIAK e cols. (1999), estudaram a estabilidade de resíduos de seis tetraciclina (clorotetraciclina, demeclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina e tetraciclina) em leite cru, armazenado a 4 e 25 °C. Os resultados apresentados indicam perdas de tetraciclina depois de 48 horas, a 4 °C, assim como em aqueles armazenados por 24 horas a 25 °C.

I.6. RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE

Resíduos de antimicrobianos em leite poderiam ocorrer, como consequência da utilização de medicamentos no tratamento de mastites e outras doenças infecciosas. Resíduos de antimicrobianos em leite têm efeitos agravantes com relação aos seguintes aspectos de saúde pública:

- Possível impacto da resistência a antimicrobianos, por microorganismos, em terapia humana.
- Desordens na flora intestinal.
- Possível ocorrência de sintomas alérgicos.
- Uma possível carcinogenicidade, se a exposição for prolongada e o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, por microorganismos.

Do ponto de vista tecnológico, a presença de resíduos de antimicrobianos não é desejável, causando perdas econômicas, por interferir no crescimento de culturas microbianas, durante a elaboração de leites fermentados, e inibem a formação de ácidos essenciais no processo fermentativo.

No caso do CLF, por volta de 1950, tornou-se evidente que ele podia causar discrasias sangüíneas graves e fatais. Por essa razão, o uso da droga é reservado para certos pacientes com infecções graves, como meningite, tifo e febre tifóide. A ingestão do cloranfenicol por consumo de alimentos contendo resíduos, pode levar a riscos para os seres humanos com graves consequências à saúde. Por este motivo o

cloranfenicol não é mais permitido na medicina veterinária. Até 1994, o limite máximo de resíduos (LMR) do cloranfenicol no leite aplicado pela Comunidade Européia era de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Depois desta data, foi constatado que não se tinha dados suficientes para demonstrar um nível de segurança, pelo qual o LMR foi alterado para tolerância zero. No Brasil a portaria Ministerial 448/98 proibiu o uso de cloranfenicol em animais produtores de alimentos, assim também a furazolidona e nitrofurazona. O regulamento 2377/90/EEC da Comissão Européia cita substâncias que não podem ser utilizadas em espécies destinadas à alimentação humana por não apresentarem níveis seguros de resíduos: cloranfenicol, clorpromacina, colquicina, dapsona, dimetridazol, metronidazol, nitrofuranos (inclui furazolidona) e ronidazol (FAO, 2002) .

I.7. ASPECTOS DE LEGISLAÇÃO

Para garantir a segurança dos consumidores, níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) têm sido estabelecidos quanto a presença de antimicrobianos em alimentos de origem animal. Estes níveis de tolerância são estabelecidos para os níveis residuais do fármaco. O LMR se baseia no tipo e quantidade do resíduo que se considera sem qualquer perigo toxicológico para a saúde humana, como é expressa mediante a dose de ingestão diária aceitável (IDA) ou por uma IDA temporária que utiliza um fator adicional de segurança. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem que provoque danos à saúde. Ela é expressa em mg kg^{-1} de peso corpóreo. A determinação da IDA é baseada nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na época da avaliação.

O risco à saúde humana devido à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos é avaliado pelo Comitê conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares, JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*). Nessas avaliações, são levados em consideração todos os dados disponíveis na literatura sobre parâmetros biológicos e toxicológicos do antimicrobiano em questão (PALERMO NETO, 1999).

Assim, para proteger a saúde humana dos efeitos adversos de antimicrobianos potencialmente perigosos, agências reguladoras de cada país têm

estabelecido LMR para as substâncias autorizadas para o uso como medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos. Em 1994, a Comunidade Européia banuiu o uso de cloranfenicol devido ao risco que a presença de seus resíduos em alimentos representa à saúde humana. O Brasil proibiu a utilização de cloranfenicol em animais produtores de alimentos em virtude da toxicidade potencial dos resíduos presentes nos produtos destinados ao consumo humano.

No contexto da Diretiva 96/23/CE à respeito do controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, a Comissão Européia apresentou os requisitos qualitativos e quantitativos de métodos confirmatórios (EC, 2002), estabelecendo limite mínimo de performance requerida (LMPR) de $0,3 \text{ ng g}^{-1}$ para resíduos de cloranfenicol em carnes, ovos, leite, produtos de aquicultura e mel (EC, 2002).

No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos (LMR) é competência do Ministério de Saúde. No caso de não estarem estabelecidos por aquele Ministério, utiliza-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pela Codex Alimentarius, os constante na Diretivas da União Européia e os utilizados pela FDA, 2002.

O controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos ocorre através do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), o qual foi instituído pela Portaria Ministerial nº. 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº. 527, de 15 de agosto de 1995, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAA). O PNCR tem como função regulamentar básica o controle e a vigilância destes resíduos em alimentos.

Nos últimos tempos tem se implantado o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) pela ANVISA, para diversos tipos de alimentos, tais como leite, carnes, ovos e mel de abelhas. O objetivo deste programa é avaliar a exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários, testar e desenvolver metodologias, estimular práticas de controle na cadeia produtiva e subsidiar futuras ações de vigilância sanitária.

O Ministério de Agricultura, Pecuária e de Abastecimento do Brasil, através da Portaria 193, de 12 de maio de 1998, aprovou o Regulamento Técnico para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de uso veterinário. O

regulamento reforça que os antimicrobianos não devem ser utilizados como aditivos na ração, como promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais, sendo vedado o uso de CLF, penicilinas, tetraciclinas e sulfonamidas para estas finalidades.

Os limites máximos dos antimicrobianos em leite fixado pelo *Codex Alimentarius*, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAA/PCRL, 2000), *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA, 2002) e Comunidade Européia (EC, 1999), estão listados na Tabela I.3.

Tabela I.3. Limites máximos de resíduos (LMR) para antimicrobianos em leite fixado pelo Codex Alimentarius, MAA, FDA e EC.

Antimicrobianos	LMR - Codex, 1999	LMR – MAA/PCRL, 2000	LMR - FDA, 2002	LMR - EC, 2002
BETA-LACTÂMICOS				
Penicilina		4 µg kg ⁻¹		4 µg kg ⁻¹
Benzilpenicilina	4 µg L ⁻¹			
Ampicilina		4 µg kg ⁻¹	10 µg L ⁻¹	4 µg kg ⁻¹
Amoxicilina		4 µg kg ⁻¹	10 µg L ⁻¹	4 µg kg ⁻¹
Cloxacilina			10 µg L ⁻¹	30 µg kg ⁻¹
Dicloxacilina				30 µg kg ⁻¹
Nafcilina				30 µg kg ⁻¹
Penetamate				4 µg kg ⁻¹
Ceftiofur	100 µg L ⁻¹	100 µg kg ⁻¹	100 µg L ⁻¹	100 µg kg ⁻¹
Cefacefrile				125 µg kg ⁻¹
Cefalexina				100 µg kg ⁻¹
Cefapirin				60 µg kg ⁻¹
Cefazoline				50 µg kg ⁻¹
Cefaperazone				50 µg kg ⁻¹
Cefquinome				20 µg kg ⁻¹
TETRACICLINAS				
Tetraciclina	100 µg L ⁻¹	100 µg kg ⁻¹	30 µg L ⁻¹	100 µg kg ⁻¹
Oxitetraciclina		100 µg kg ⁻¹		100 µg kg ⁻¹
Clortetraciclina		100 µg kg ⁻¹		100 µg kg ⁻¹
SULFONAMIDAS				
Sulfadimidina	25 µg L ⁻¹			100 µg kg ⁻¹
Sulfametazina		100 µg kg ⁻¹		100 µg kg ⁻¹
Sulfametoxazol				100 µg kg ⁻¹
Sulfaquinoxalina				100 µg kg ⁻¹
Sulfadimetoxina		100 µg kg ⁻¹	10 µg L ⁻¹	100 µg kg ⁻¹
FLUOROQUINOLONAS				
Enrofloxacina				100 µg kg ⁻¹
Ciprofloxacina				75 µg kg ⁻¹
Marbofloxacina				30 µg kg ⁻¹
Danofloxacina				30 µg kg ⁻¹

Continuação da Tabela I.3.

Antimicrobianos	LMR - Codex, 1999	LMR – MAA/PCRL, 2000	LMR - FDA, 2002	LMR - EC, 2002
AMINOGLICOSÍDEOS				
Espiramicina	200 µg L ⁻¹			
Espectinomicina	200 µg L ⁻¹			200 µg kg ⁻¹
Estreptomicina	200 µg L ⁻¹	200 µg kg ⁻¹		200 µg kg ⁻¹
Diidroestreptomicina	200 µg L ⁻¹		125 µg L ⁻¹	200 µg kg ⁻¹
Neomicina	500 µg L ⁻¹	500 µg kg ⁻¹	150 µg L ⁻¹	1500 µg kg ⁻¹
Diminazina	150 µg L ⁻¹			
Gentamicina				100 µg kg ⁻¹
MACROLÍDEOS				
Eritromicina		40 µg kg ⁻¹		40 µg kg ⁻¹
Espiramicina				200 µg kg ⁻¹
Tilmicosina				50 µg kg ⁻¹
Tylosin				50 µg kg ⁻¹
CLORANFENICOL e compostos relacionados				
Cloranfenicol		0 µg kg ⁻¹		
Tianfenicol				50 µg kg ⁻¹
LINCOMICINAS				
Lincomicina				150 µg kg ⁻¹
Pirlimicina				100 µg kg ⁻¹
OUTROS ANTIBIÓTICOS				
Rifaximin				60 µg kg ⁻¹
Novobiocin				50 µg kg ⁻¹
Bacitricina				100 µg kg ⁻¹
Ácido clavulânico				200 µg kg ⁻¹

MAA/PCRL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil/Programa de controle de resíduos em leite; FDA: Food and Drug Administration (EUA); EC: European Commission (EC, 1999).

I.8. MÉTODOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

Para garantir a saúde do consumidor, é necessário que seja realizado o controle de qualidade dos alimentos de origem animal quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade

adequadas para quantificar a presença de resíduos de antimicrobianos nas diferentes matrizes.

O monitoramento de alimentos contaminados com resíduos de antimicrobianos tem aumentado devido à importância da repercussão na saúde pública. Os antimicrobianos continuam sendo utilizados por muitos produtores, e permanece o risco de que o leite de algumas vacas apresente resíduos que excedam os níveis de segurança e tolerância, sendo este leite processado ou usado para suprimento alimentar (DAVIDSON & BRANEN, 1993).

Várias mudanças têm sido feitas nas indústrias de laticínios, devido ao potencial de resíduos de medicamentos em leite, e esta evolução foi iniciada pelo aumento na detectabilidade dos métodos de análises (CROUBELS e cols., 1994). Para verificar a presença de antimicrobianos no leite, testes de inibição microbiana (MIC) têm sido empregados (BARRY, 1986; DAVIDSON & BRANEN, 1993).

ANG e cols., (1997), realizaram um estudo comparativo entre métodos utilizando cromatografia líquida e inibição microbiana para determinação de resíduos de amoxicilina e ampicilina em leite. No entanto, de modo geral, estes testes, apesar de serem bastante úteis para procedimentos de triagem (*screening*), não são seletivos e tampouco permitem obter informações quantitativas.

I.8.1. ENSAIOS QUALITATIVOS (TRIAGEM) PARA RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

Como medida inicial, os programas de controle de resíduos de antimicrobianos em alimentos devem incluir métodos de triagem, os quais não deverão exigir investimentos em instrumentos laboratoriais complexos, nem em reagentes ou na capacitação de pessoal a elevados custos. Devem ser eficazes e economicamente viáveis. Os métodos de triagem ou seleção podem ser definidos brevemente como métodos de análise qualitativos ou semiquantitativos que detectam a presença numa espécie em uma matriz de interesse, de um remanescente residual de uma substância em concentração igual ou inferior ao LMR. Um resultado suspeito indica que pode ter sido superado o valor do LMR e a amostra deverá ser analisada

novamente através de métodos confirmatórios, fornecendo fundamento para uma eventual ação regulatória.

Ensaio de inibição imunológica ou microbiana são comumente usados para identificar a presença de resíduos antimicrobianos no leite. Ensaio de triagem tradicionais são baseados na inibição do crescimento de microorganismos pela presença dos resíduos de antibióticos presentes na amostra teste. Estes ensaios estão baseados em processos de difusão ou turvação. O crescimento de um organismo indicador, em uma cultura líquida transparente, pode ser seguido monitorando a turvação que aumenta com o tempo. Nos ensaios de difusão, o material a ser analisado difunde por um meio nutriente em base de agar que foi aplicado uniformemente com o microorganismo susceptível. Na incubação, o desenvolvimento de uma zona de inibição de germinação e crescimento indica a presença do antimicrobiano (NIELSEN, 1999). Em testes que empregam discos, o diâmetro da zona de inibição do organismo específico é comparado com o tamanho da zona produzida pela amostra controle. O tamanho da zona de inibição é influenciado por vários fatores, entre esses a densidade do inóculo, profundidade do agar, composição média do agar, tempo de incubação e temperatura (BARRY, 1986; DAVIDSON & BRANEN, 1993).

Os ensaios de triagem para resíduos de antimicrobianos em leite devem ser procedimentos de monitoramento eficiente, simples e rápido (permitindo analisar numerosas amostras). Porém, eles não são específicos e só respondem a resíduos biologicamente ativos que inibem o crescimento do microorganismo. Antes de 1991, o ensaio de disco de *Bacillus stearothermophilis* (BSDA) era o método oficial para avaliar a presença de resíduos de medicamentos em leite *in natura*. Desde então, contínuas melhorias nos kits comerciais existentes, assim como desenvolvimento de novos kits de triagem foram realizados e introduzidos no mercado (ver Tabela I.4). Porém, não há nenhum kit ideal atualmente disponível para a detecção de resíduos de antimicrobianos em leite. O teste de triagem para resíduos específicos apresenta limites de detecção que estão muitas vezes acima do nível de tolerância.

O Charm II é um ensaio radioisotópico rápido comumente usado e pode detectar os seguintes grupos de antimicrobianos: beta-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, novobiocina, sulfonamidas e cloranfenicol. O

ensaio é baseado na competição entre uma droga marcada e a droga presente na amostra, para um número limitado de sítios específicos de ligação sobre a superfície das bactérias que são adicionadas na amostra.

Entre as desvantagens dos testes de triagem destacam-se os seguintes aspectos: não permitem identificar o analito que foi responsável pela resposta positiva do ensaio, assim como não permitem obter informações quantitativas, assim como, muitas vezes, somente detectam os antimicrobianos quando as concentrações destes se encontram muito acima dos LMR. Os resultados positivos de um teste de triagem podem ser decorrentes da resposta positiva da presença de um ou mais analitos. A presença de altas quantidades de células somáticas ou secreções naturais na amostra pode resultar em falsos positivos (NIELSEN, 1999).

Tabela I.4 Exemplos de kits de triagem para resíduos de antimicrobianos.

Teste	Antimicrobiano detectado
STOP (<i>Swab Test Premises</i>)	Beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos
CAST (<i>Calf Antibiotic Sulfa Test</i>)	Beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos e sulfonamidas
FAST (<i>Fast Antibiotic Swab Test</i>)	Beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos e sulfonamidas
LAST (<i>Live Animal Swab Test</i>)	Beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos, usando a modificação do teste STOP
Charm AIM,	Beta-lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos e Macrolídeos
Charm II	Beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas, espectinomicina e cloranfenicol
SNAP	Beta-lactâmicos, tetraciclina
CITE	Sulfonamidas
Charm SL,	Beta-lactâmicos, tetraciclina,

Fonte: NIELSEN, 1999.

Recentemente KANG´ETHE e cols., 2005, usando os testes de triagem Charm-AIM e Charm-SL verificaram a contaminação de leite por tetraciclina e beta-

lactâmicos. O teste Charm-AIM permite a detecção de cinco famílias de antimicrobianos; beta-lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e sulfonamidas, enquanto o teste Charm-SL possibilita apenas a detecção de resíduos de tetraciclinas e beta-lactâmicos. Os pesquisadores mencionam a alta prevalência de resíduos de antimicrobianos em leite, encontrando resíduos de antibióticos beta-lactâmicos em 11% do leite cru, comercializado no Quênia, África.

I.8.2. MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS

A determinação de resíduos de antimicrobianos envolve a quantificação de concentrações na ordem de mg kg^{-1} ou $\mu\text{g kg}^{-1}$; o que dificulta os procedimentos analíticos, principalmente em amostras complexas como alimentos, fazendo com que a utilização de técnicas cromatográficas seja, na maioria dos casos, imprescindível. Considerando as propriedades físico-químicas dos antimicrobianos, a HPLC tem sido a mais empregada dentre as técnicas analíticas, associada a diferentes detetores como UV, arranjo de diodos, fluorescência e espectrômetro de massas. Outros métodos empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos são a cromatografia gasosa (MEETSCHEN & PETZ, 1990) e eletroforese capilar (MARZUELA & MORENO-BONDI, 2004). Para a confirmação do resíduo, o método de espectrometria de massas é o mais recomendado. Apesar das muitas vantagens frente a outras técnicas, a HPLC não pode ser utilizada em campo na análise de rotina para monitoramento de resíduos, pois necessita de laboratórios, equipamentos e treinamentos especializados (CROUBELS & PETEGHEM, 1994).

Entre os trabalhos sobre resíduos de antimicrobianos em leite por HPLC destacam-se os beta-lactâmicos (HARIK-KHAN & MOATS, 1995; SORENSE e cols., 1997; TAKEBA e cols., 1998; MOATS & ROMANOWSKI, 1998; SORENSE & SNOR, 2000), tetraciclinas (MOATS & HARIK-KHAN, 1995; FURUSAWA, 1999a; BOATTO & cols., 1999; OKA e cols., 2000; CINQUINA e cols., 2003a; FURUSAWA e cols., 2003a), sulfonamidas (VIÑAS e cols., 1996; LUNN & SCHMUFF., 1997.; FURUSAWA, 2000; VAN RHIJN e cols., 2002), quinolonas (TYCZKOWSK e cols., 1994; HORMAZABAL & YNDESTAD, 1994; ROYBAL e cols., 1997; CINQUINA e cols., 2003b) e cloranfenicol (LONG e cols., 1999).

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação bastante empregada hoje em dia, principalmente por causa de vantagens como resolução, eficiência, análise rápida e pouco consumo de solventes e amostra, em comparação com a HPLC (LIN e cols.; 1997a,b). A CE pode atuar como uma alternativa complementar à HPLC nas análises de alimentos por sua grande versatilidade e flexibilidade (DONG, 1999).

Têm sido relatados trabalhos na literatura usando a CE acoplada a espectrometria de massa para determinação de antimicrobianos, tais como quinolonas (SCHMITT-KOPPLIN e cols., 1999; BARRÓN e cols., 2001; HORSTKOTTER e cols., 2002; HERNÁNDEZ e cols., 2002, LIN e cols., 2004), sulfonamidas (LIN e cols., 1997a,b), beta-lactâmicos (HERNÁNDEZ e cols., 1999), tetraciclina (TAVARES & McGUFFIN.; 1994; CASTELLANOS e cols., 2000).

Existem poucos trabalhos descritos na literatura sobre a determinação de resíduos de antimicrobianos em leite por eletroforese capilar (CHEN & GU, 1995, SANTOS e cols., 2007), especialmente com detector UV, possivelmente porque a detectabilidade do equipamento não permite a quantificação abaixo dos limites máximos residuais.

Para a análise de resíduos de antimicrobianos em alimentos, anterior a quantificação por métodos instrumentais, são necessárias várias etapas de preparo de amostra.

I.8.2.1. PREPARO DE AMOSTRA

De modo geral, o preparo de amostras visa a eliminação de interferentes e a concentração do analito para que esse possa ser determinado com adequada exatidão e precisão. Dentre as várias etapas envolvidas no preparo de amostra estão a extração, limpeza (*clean-up*), concentração, ajuste de condições (por exemplo, pH) e outras. Estas etapas geralmente são trabalhosas e requerem bastante tempo e recursos, podendo ainda introduzir erros críticos na análise.

Uma técnica ideal de preparo de amostra, que inclui extração, limpeza e concentração, deve apresentar facilidade no manuseio, rapidez, baixo custo, ser compatível com a faixa de detecção do instrumento de análise e apresentar boa

performance analítica, incluindo eficiência, seletividade e aplicabilidade para determinações simultâneas (PAWLISZYN, 1997).

Devido á complexidade inerente da matriz dos produtos alimentícios, a escolha da técnica de preparo de amostra é um passo importante, que irá depender da matriz, das propriedades físico-químicas do composto a ser determinado, da sua concentração, do método de análise, e da precisão e exatidão desejada (ANDERSON, 1991).

Nas Tabelas 1.5a ate 1.5g estão resumidos métodos cromatográficos e eletroforéticos reportados na literatura para a determinação dos antimicrobianos tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol, fluoroquinolonas e beta-lactâmicos em leite.

Tabela I.5a Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

<i>Antimicrobiano</i>	Preparo de amostra	Método	Fase estacionaria	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
OTC TC CTC	MSPD C ₈ , 40 µm, endcapped L: hexano E: etilacetato-ACN (1:3, v/v)	HPLC-UV	C₈ - ODS 10 µm, 30 cm x 4 mm	0,01 mol L ⁻¹ AO:ACN (70:30 v/v)	63-93	-	LONG e cols., 1990a
TC OTC	Ext. ACN, sulfato de amônio, tampão fosfato pH 8,2; TBA, diclorometano	HPLC-UV	Nucleosil 120C ₁₈ , Hichrom 5 µm, 250 x 4,6 mm	240 mL ACN- 760 mL AF pH 2,3 (50:50)	72-85	-	FLETOURIS e cols., 1990
OTC TC CTC DXC	SPE, C ₁₈	LC/FAB- MS	C ₈ , Bakerbond	MeOH: ACN :AO 0,5 mol L ⁻¹ (pH2) (v/v/v)	73-83	-	OKA e cols., 1994
TC OTC CTC	Ext. protéica 1mL 1 mol L ⁻¹ HCl + 15 mL ACN LLE: hexano, cloreto de metila, ter-butyl álcool.	HPLC-UV	PLRP-S 4,6 x150 mm, 100 Å, 5 µm.	0,02 mol L ⁻¹ AF +0,01 mol L ⁻¹ SDS, ACN 72:28 OTC 68:28 CTC	>80	2-4 µg mL ⁻¹	MOATS & HARIK-KAHN, 1995
OTC TC DXC	Extração coluna cromatográfica, afinidade quelante SPE C ₁₈	CE-UV	50 cm, 7 µm, 15 kV, 23 °C	10 mmol L ⁻¹ SDS, 50 mmol L ⁻¹ borato, 50 mmol L ⁻¹ , pH 8,5	40-79	1,3-5,3 ng mL ⁻¹	CHEN & GU, J. 1995

Tabela I.5b Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

<i>Antimicrobiano</i>	Preparo de amostra	Método	Fase estacionaria	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
OTC TC MC CTC DXC MTC DMC	Desproteínização por acidificação Centrifugação Coluna de sepharose quelante ultracentrifugação	HPLC-UV	PLRP-S 5 µm, 100 Å	0,01 mol L ⁻¹ AO: MeOH: ACN (70:8:22)	60	< 5 ng mL ⁻¹	CARSON & BRESLYN 1993
OTC TC CTC	MSPE C ₁₈ , 40 µmol L ⁻¹ , 60 °C, SPE C ₁₈	HPLC-DAD	Lichrosorb RP 18	MeOH/ACN /0,01 mol L ⁻¹ AO (17,5:17,5:65 v/v/v)	>48 SPE >89 MSPE	15 ng g ⁻¹	BRANDSTETEROVÁ e cols., 1997
TC CTC DXC MC MTC DMC	Desproteínização com Mcllvaine, centrifugação 2300 rpm, SPE C ₈ endcapped	HPLC-UV	C ₁₈ , Merck	A: 80% AO 0,01 mol L ⁻¹ + 1% tetrahydrofurano + 1% trietalamina + 20% ACN B: ACN+MeOH (50:50 v/v) gradiente	80	-	ABETE e cols., 1997
MC OTC TC DMC MTC 4-epi-anidroTC	SPME Fibra Carbowax/TPR (PDMS/DVB)	HPLC/ESI-MS	RP 18 e	A: ACN +0,2% ácido fórmico B: água + 0,2% ácido fórmico, gradiente	-	4 –40 ng mL ⁻¹	LOCK e cols., 1999
OTC	LLE	HPLC-UV	Supelcosil LC-18-DB	AF, pH 2,3-ACN (76:24 v/v)	> 86	5 ng mL ⁻¹	BOATTO, 1999
OTC	Desproteínização-filtração com ATCA 20%	HPLC-UV	Lichrospher 100 RP-8 endcapped	ACN: ácido acético:água (28:4:68, v/v/v)	90	0,05 µg mL ⁻¹	FURUSAWA, 1999a
OTC Sulfadimidina	LLE	HPLC-UV	C ₄	ácido succínico 1,25 mmol L ⁻¹	89	0,04 µg mL ⁻¹	FURUSAWA, 2003b

Tabela I.5c Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

Antimicrobiano	Preparo de amostra	Método	Fase estacionária	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
TC OTC CTC DXC	SPE C ₁₈ endcapped	HPLC-UV	Lichrospher 100 RP-8 end- capped C ₈	ACN 7%-ácido acético (em H ₂ O) 35:65 v/v	95-103	0,1-1,0 ug ml ⁻¹	FURUSAWA, 2003a
OTC TC CTC DXC	SPE: HLB Oasis	HPLC-UV	C ₁₈	0,01 mol L ⁻¹ Oxalato:ACN:MeOH (60:24:15, v/v/v)	> 81	117,2 ug mL ⁻¹	CINQUINA e cols., 2003a.
TC OTC CTC DXC	Desproteínização com ATCA, centrifugação 2500 rpm x 10 min.	HPLC-UV	Novapak RP 8, T 35°C	A:AO 0,01 mol L ⁻¹ , ACN: trietanolamina (90:90:0,1; v/v/v) B: 100 ACN gradiente	67-90	37,5 ng mL ⁻¹	DENOBILO & NASCIMENTO, 2004
TC OTC CTC MTC DXC	LLE (hexano)	HPLC-DE	C ₁₈	fosfato de sódio monobásico diidrato (pH 2,2) 0,05 mol L ⁻¹ :ACN (78:22, v/v)	88	-	ZHAO e cols. 2004
TC OTC CTC	Desproteínização com ácido succínico centrifugação a 4 °C. SPE-HLB Oasis	HPLC- MS-MS	C ₈ endcapped	ácido fórmico 0,1% -ACN- MeOH (75:18:7, v/v/v)	75	-	ANDERSEN e cols., 2005

Tabela I.5d Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

Antimicrobiano	Preparo de amostra	Método	Fase estacionária	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
TC CLF AMPI AMOX CLOXACILINA PEN	Desproteínização ATCA 20% Centrifugação SPE C ₁₈ E: ACN	HPLC-UV CE-UV	Gemini C ₁₈ 5µm (150 mm x 4,6 mm) Capilar 58,5 cm, 75µm	FM: ACN:MeOH:0,05 mol L ⁻¹ fosfato de potássio, pH 3,5 (20:10:80, v/v/v) + 5 mmol L ⁻¹ 1-decanosulfonato de sódio Eletrólito: 2,7 10 ⁻² fosfato de potássio + 4,3 10 ⁻² tetraborato de sódio, pH 8.	13-99	-	SANTOS e cols., 2007
ENRO CIPRO	Ultrafiltração 3000 Dalton	HPLC-UV	Spherisorb 3 µm fenil	ACN-MeOH-trietilamina-AF (85%)- H ₂ O 99:0,45:0,4:81,15 + 0,005 mol L ⁻¹ dodecanosulfonato pH 2,5	>73	5 ng mL ⁻¹	TYCZKOWSKA e cols., 1994
ENRO	LLE NaOH/ACN/dietil eter/hexano, centrifugar + ácido fosfórico/MeOH centrifugar	HPLC-F	PLRS-S 5µm, (159 x 4,6mm)	A: 0,002 mol L ⁻¹ heptano sulfonato+0,002 mol L ⁻¹ AF, vazão 0,7 mL min ⁻¹ B: ACN C: MeOH gradiente	86	3ng mL ⁻¹	HORMAZABAL & YNDESTAD 1994
CIPRO ENRO	C ₁₈	HPLC-UV	C ₁₄ Zorbax bonus-RP	0,05 mol L ⁻¹ AF, pH 3,4-ACN (87:13, v/v)	84	0,05-1,00 µg kg ⁻¹	CINQUINA e cols., 2003b
CIPRO ENRO MARBO DANO NFX (p.i)	SPE Cartucho strata X: SDB	HPLC-UV	Aqua C ₁₈	A: 25 mm AF, pH 3 B: ACN gradiente	70-103	2,4-10 ng mL ⁻¹	MARZUELA & MORENO-BONDI, 2004

Tabela I.5e Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

Antimicrobiano	Preparo de amostra	Método	Fase estacionária	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
sulfonamidas (10)	Ext. clorofórmio, acetona, hexano, fosfato de potasio	HPLC-UV	LC-18-DB 250 x 4,6 mm pré-coluna 2 cm, 0,5 µm	MeOH-KH ₂ PO ₄ (12:88 v/v) MeOH- KH ₂ PO ₄ (30:70, v/v)	>44	-	SMEDLEY & WEBER, 1990
sulfonamidas P.I: sulfamerazina	Ext. acetona-clorofórmio	HPLC-UV	C ₁₈ Supelcosil LC ₁₈ , 3 µm, 7,5cm, 4mm, T 45°C	0,017 mol L ⁻¹ AF - ACN (90:10 v/v)	73-94	-	LONG e cols., 1990b
SMZ	Ext. clorofórmio tampão fosfato, pH 5 SPE ciclobond I: β-ciclodextrina	HPLC-UV	LC-18-DB	700 mL tampão acetato de amônio pH 4,7- 300 mL MeOH	83-88	-	AGARWAL, 1990
SMZ sulfadiazina Sulfatiazol SQX sulfadoxina sulfadimetoxina	MSPD – C ₁₈ endcapped, 40 µm, 2 g/15 mL Lavagem; hexano Eluição diclorometano	HPTLC	-	Misturas de MeOH, amônio 2% e diclorometano (30:70, 15:85 e 5,95, v/v)	>83	4µg kg ⁻¹	VAN POUCKE e cols. 1991
sulfadimidina	20% ATCA-MeOH (4:1 v/v) ultrafiltração molcut II	HPLC-UV	Lichrospher 100 RP-8, endcapped	4% ácido acético -ACN (6:4 v/v)	>80,8	0,01 µg mL ⁻¹	FURUSAWA, 1999b
sulfonamida SMZ sulfadimetoxina	Ext. liq + ultrafiltração ultra free mc/biomax	HPLC-DAD	Mightysil RP-18 GP	25% etanol em H ₂ O	92-94	5ng mL ⁻¹	FURUSAWA, 2000

Tabela I.5f Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

Antimicrobiano	Preparo de amostra	Método	Fase estacionaria	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
sulfadiazina sulfadimidina SMX sulfadoxina sulfadimetoxina dapsone	LLE ACN, centrifugação	LC-MS- MS	C ₁₈ (15 cm x 3 mm, 5 µm) vazão 400 µL/min	ACN: 10 mmol L ⁻¹ acetato de amônio, pH 3,5 gradiente	-	5 µg kg ⁻¹	VAN RHIJN e cols., 2002
6 sulfonamidas 3 nitrofuranos CLF	LLE clorofórmio- acetona, acetato de sódio 0,02 mol L ⁻¹ , Hexano	HPLC-UV	C ₁₈	Acetato de sódio: ACN gradiente	>65	4 µg kg ⁻¹	PEREZ e cols., 2002
SMZ sulfadimetoxina sulfatiazol sulfadiazina sulfametizol sulfapiridina	SPE Lichrolut EN (etilvinilbenzeno, divinilbenzeno, 200g, m erck)	LC/APCI- MS	Phemonenex ODS E 5µm (250 mm X 25 mm)	ACN: H ₂ O:0,1 mol L ⁻¹ acetato de amônio (17:33:50 v/v/v), vazão 200 µl/min	93,2	-	KIM e cols., 2003
CLF	MSPD C ₁₈ (2 g) L: 8 mL hexano + 8 mL benzeno E: 8 mL acetato de etila	HPLC- DAD	C ₁₈	0,017 mol L ⁻¹ AF:ACN (65:35, v/v) T 35°C	69	1,25 ng mL ⁻¹	LONG e cols., 1999
CLF	Extração com acetato de etila + terra de diatomea SPE C ₁₈	CG-MS ionização química negativa	Metilsilicone 30 m x 0,25 mm, 0,25µm	-	-	0,5-2 ng mL ⁻¹	KIJAK, 1994

Tabela I.5g Preparos de amostra e técnicas utilizadas na determinação de tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas e cloranfenicol em leite.

Antimicrobiano	Preparo de amostra	Método	Fase estacionaria	Fase móvel ou eletrólito	Rec* (%)	LOD/LOQ	Referência
CLF	Extração com diálise difásico + acetato de etila + sulfato de sódio	HPLC-UV	Novapak C ₁₈	-	-	5 ng mg ⁻¹	BAYO e cols., 1994
CLF Florfenicol tiamfenicol	SPE C ₁₈ , Deritivização	CG	-	-	92-104	5 ng mL ⁻¹	PFENING e cols., 1998

HPLC-F: cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência; HPLC-DE: cromatografia líquida de alta eficiência com detetor eletroquímico, AO: ácido oxálico em água, AF: ácido fosfórico em água³²¹, L: lavado, E: eluição, Rec: recuperação.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

II. 1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para determinação de antimicrobianos em fármacos e em leite, empregando a eletroforese capilar e a cromatografia líquida de alta eficiência.

II. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos compreendem:

- Desenvolver, otimizar, usando planejamento experimental, e validar a metodologia analítica para a análise, por CE-DAD, de fármacos a base de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol, danofloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina ou cloranfenicol.
- Desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação simultânea de resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol e cloranfenicol em leite por HPLC-DAD.
- Avaliar diferentes preparos de amostra.
- Avaliação de resíduos dos antimicrobianos em leite comercializados na região de Campinas, empregando o método HPLC-DAD validado.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de métodos para a determinação de antimicrobianos em fármacos, usando a CE

III.1 INTRODUÇÃO

A eletroforese é um método de separação baseado nas velocidades de migração diferenciais de espécies carregadas em um campo elétrico. Esta técnica é aplicável na determinação de uma grande variedade de analitos em amostras diversas, entre esses, antimicrobianos em formulações farmacêuticas.

A técnica de eletroforese capilar possui uma série de vantagens, tais como: rapidez, versatilidade, baixo custo por análise, alto poder de separação (resolução) e consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes. Entretanto, esta técnica oferece algumas limitações, especialmente no que refere a sua baixa detectabilidade (WESTON & BROWN, 1997).

O presente capítulo apresenta o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas empregando a eletroforese capilar (CE), mostrando as vantagens da técnica frente a HPLC na quantificação das diferentes famílias de antimicrobianos em formulações farmacêuticas.

As monografias oficiais descritas nas Farmacopéias, de modo geral, recomendam o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação de antimicrobianos em formulações farmacêuticas. Vale ressaltar que para cada analito, mesmo quando pertencente a mesma família do antimicrobiano, uma monografia é apresentada, envolvendo diferentes condições de análise como fase estacionária, fase móvel e outros, o que demanda gastos elevados de solventes orgânicos e requer um estoque de colunas de polaridades diferentes. Nesse sentido, a eletroforese capilar é uma técnica alternativa para o controle de qualidade de fármacos, não somente pelo custo da análise, como também pela rapidez e reduzida geração de resíduos.

III.2 OBJETIVOS

Neste capítulo, se tem como objetivo desenvolver, usando planejamento experimental, e validar metodologia analítica para a análise de fármacos a base de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol, danofloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina e cloranfenicol por eletroforese capilar de zona.

III.3 EXPERIMENTAL

III.3.1 EQUIPAMENTOS

Equipamento de eletroforese HEWLETT PACKARD 3D CE (Waldbronn, Alemanha), com detetor de arranjo de fotodiodos (DAD, Diode Array Detection), software HP 3D Chemstation (Hewlett-Packard), operado em Windows 95 (Microsoft).

As análises cromatográficas foram realizadas empregando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA), composto por um sistema binário 1525; injetor 7725 (Rheodyne, EUA), com amostrador de 50 µL; detetor de arranjo de fotodiodos (DAD) 2996 (Waters, EUA). A aquisição de dados foi realizada mediante interface Millennium³² versão 4.0 e microcomputador Pentium III, 900 MHz, HD 20 G com impressora HP 640C (Hewlett Packard, EUA).

III.3.2 CAPILAR ELETROFORÉTICO

Capilar de sílica fundida de 52,1 cm de comprimento efetivo, 60,6 cm, comprimento total e 50 µm de diâmetro interno (Agilent, Alemanha).

Coluna analítica de fase reversa C₈ Zorbax SB 250 x 4,6 mm, 5 µm (Alltech, EUA). Coluna analítica de fase reversa C₁₈ LiChroCART® 125 x 4,6 mm, 5 µm, LiChrospher® (Merck, Alemanha) e coluna de guarda C₁₈ Lichrocart® 6,0 x 4,0 mm (Merck, Alemanha).

III.3.3 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e no preparo de soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Foram utilizados fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), n-dodecilsulfato de sódio (SDS), carbonato de cálcio, EDTA sódico e ácido acético da Merck (Alemanha). Acetato de sódio e metanol foram da J.T.Baker (EUA) e hidrocloreto de tris (tris[hidroximetil]amino metano hidrocloreto, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$) da Sigma (EUA). Hidróxido de sódio foi da LabSynth (Brasil) e ácido clorídrico da J.T.Baker (EUA).

III.3.4 PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos foram hidrocloreto de tetraciclina 92,6 % (TC), hidrocloreto doxiciclina (DXC), enrofloxacina 99,7 % (ENRO), sulfaquinoxalina sódica 95 % (SQX), sulfametazina 99 % (SMZ), sulfametoxazol (SMX) da Sigma (EUA). Os padrões oxitetraciclina diidratada 998 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (OTC), hidrocloreto de clortetraciclina 920 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (CTC), cloranfenicol (CLF), penicilina G de potássio 1589 ng mg^{-1} (PEN), ampicilina triidratada 960 $\mu\text{g mg}^{-1}$ (AMP) e amoxicilina (AMOX) foram da ICN Biomedical Inc. (EUA). O mesilato de danofloxacina 80 % (DANO) foi da Pfizer (EUA) e a ciprofloxacina 98 % (CIPRO) foi da Biochemical, Fluka (Suíça).

III.3.5 PREPARO DE PADRÕES E SOLUÇÕES

As soluções estoque dos antimicrobianos de concentração de 1,00 mg mL^{-1} foram preparadas a cada 90 dias, dissolvendo-se separadamente cada padrão analítico em metanol. As fluoroquinolonas foram dissolvidas com 2 % v/v de ácido acético. As soluções foram estocadas em freezer (-18 °C) e descongeladas anterior ao uso para o preparo das soluções de trabalho.

As soluções de trabalho dos antimicrobianos na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e abaixo desta concentração foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções estoque com água Milli Q.

Para a CE foram preparados os seguintes eletrólitos:

- Fosfato de sódio 50, 100 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} + SDS 10 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Fosfato de sódio 20, 60, 100, 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Fosfato de sódio 100 mmol L^{-1} + SDS 10, 50 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Tetraborato 50 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Tetraborato 50 mmol L^{-1} + SDS 10 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Tetraborato 20, 60, 100, 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Acetato de sódio 20, 60, 100, 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 4,5.
- Tris 20, 60, 100, 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Carbonato de sódio 20, 60, 100, 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, e pH 11.
- Carbonato de sódio 40, 80 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 10,5; 12,5.
- Carbonato de sódio 50 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 10, 12.
- Carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 9,3; 11; 12,7.
- Carbonato de sódio 70 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 10; 12.
- Carbonato de sódio 43, 77 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 11.
- Fosfato de sódio /tetraborato de sódio 20/20, 20/40, 20/60, 20/100, 40/40, 40/60, 50/50, 60/40, 80/20, 100/20, 100/50, 120/20, 140/20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Fosfato de sódio 80 mmol L^{-1} / tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} + SDS 10, 50 mmol L^{-1} EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5.
- Fosfato de sódio 40 mmol L^{-1} / tetraborato de sódio 40 mmol L^{-1} + SDS 10 mmol L^{-1} , pH 8; 8,5; 9; 10.
- Fosfato de sódio 40 mmol L^{-1} / tetraborato de sódio 40 mmol L^{-1} + SDS 15 mmol L^{-1} , pH 8; 9; 10.
- Fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} / tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} + SDS 10, 20 mmol L^{-1} , pH 8,5.

- Fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹/ tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹+ SDS 10 mmol L⁻¹, pH 7,5; 8; 9; 9,5.
- Fosfato de sódio 115, 125 mmol L⁻¹/ tetraborato de sódio 20 mmol L⁻¹+ EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 7,5; 9,5.
- Fosfato de sódio 120 mmol L⁻¹/ tetraborato de sódio 20 mmol L⁻¹+ EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 6,8; 8,5; 10,2.
- Fosfato de sódio 111, 129 mmol L⁻¹/ tetraborato de sódio 20 mmol L⁻¹+ EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5.

Os valores de pH dos eletrólitos foram ajustados com NaOH 0,1 e 1 mol L⁻¹ ou HCl 0,1 e 1 mol L⁻¹, antes de completar o volume final.

III.4 PROCEDIMENTOS

III.4.1 CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS INICIAIS NA SEPARAÇÃO DE SMX, SMZ, SQX, CLF, OTC, TC, DXC, CTC, DANO, CIPRO E ENRO

Antes do uso diário, o capilar foi condicionado da seguinte maneira: água (10 min), NaOH 1 mol L⁻¹ (2 min), NaOH 0,1 mol L⁻¹ (3 min) e eletrólito de corrida (5 min). Depois de cada determinação o capilar foi lavado com água (2 min), NaOH 1 mol L⁻¹ (1 min), NaOH 0,1 mol L⁻¹ (1 min) e eletrólito de corrida (2 min). O capilar foi lavado e guardado com água (30 min), depois do trabalho diário.

As condições iniciais de separação para a determinação dos antimicrobianos foram baseadas no trabalho de CHEN & GU, 1995. Estas condições foram 50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio + 50 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio + 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,5; voltagem de 13 kV e temperatura de 23 °C.

III.4.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS

Foram realizados estudos com os seguintes eletrólitos e pH:

- Fosfato de sódio na faixa de 20-140 mmol L⁻¹, no pH 8,5;
- Tetraborato de sódio na faixa de 20-140 mmol L⁻¹, no pH 8;

- Acetato de sódio na faixa de 20-140 mmol L⁻¹, no pH 4,5;
- Tris na faixa de 20-140 mmol L⁻¹, no pH 8,5 e 11;
- Carbonato de sódio na faixa de 40-80 mmol L⁻¹, nos pH na faixa de 9,3 a 12,7;
- Fosfato de sódio /tetraborato de sódio na faixa de 20-140 para Fosfato de sódio e 20-100 para tetraborato de sódio, na faixa de pH 6,8 a 10,2. Em algumas soluções foi utilizado SDS na faixa de concentração de 10 a 20 mmol L⁻¹.

Os estudos iniciais foram realizados na forma univariada e os subseqüentes envolveram estudos multivariados, utilizando planejamento experimental, onde as variáveis pH, voltagem, temperatura e concentração do eletrólito foram avaliadas.

III.4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS, FLUOROQUINOLONAS, SULFONAMIDAS E CLORANFENICOL EM FÁRMACOS POR ELETROFORESE CAPILAR

Etapas prévias anteriores à validação do método devem ser realizadas para garantir que o sistema selecionado para o desenvolvimento do método, obtendo resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Essas etapas incluem a avaliação da conformidade do sistema e a estabilidade das soluções e amostras.

CONFORMIDADE DO SISTEMA

Para estabelecer a conformidade do sistema os seguintes parâmetros foram avaliados: resolução (Rs), número de pratos (N) e fator de assimetria (As). Como critérios de aceitação foram adotados os seguintes valores: **Rs**>2,0 e **N**>2000 (SHABIR 2003).

Os mesmos procedimentos e critérios de aceitação foram utilizados para os métodos de HPLC, tendo em vista que esta técnica foi utilizada para avaliar a exatidão do método de eletroforese capilar desenvolvido para a quantificação de TC, CLF, CIPRO, ENRO e SMX.

ESTABILIDADE

As estabilidades das soluções padrão utilizadas de todos os antimicrobianos foram anteriormente avaliadas usando a HPLC-DAD e estão descritas no item IV.3.7.3.2.

SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada por testes de degradação dos antimicrobianos (soluções padrões na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) de DANO, CIPRO, ENRO, SMX, SMZ, SQX, OTC, TC, CTC e CLF, em meio básico ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), ácido ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), oxidante (H_2O_2 3 %) e temperatura à $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a exposição dos analitos às condições de estresse por uma hora, as soluções foram diluídas com o eletrólito 1:10 v/v e o pH acertado para o valor do pH do eletrólito de corrida. Todas as análises foram realizadas em duplicata. O objetivo deste estudo foi avaliar e otimizar o método no sentido de permitir a separação de possíveis produtos de degradação dos analitos (SHABIR 2003).

Como critério de aceitação foi adotado que a resposta dos picos interferentes, no tempo de retenção do analito, deve ser inferior a 0,5 % da resposta no limite de quantificação (SHABIR, 2003).

CURVA ANALÍTICA

As curvas analíticas foram construídas em duplicatas nos níveis de concentração de 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, para CTC, OTC e DXC; 10,0; 50,0; 100; 200 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para TC e 50,0; 100; 150; 200; $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ para CLF, CIPRO, ENRO, SMZ e SMX (faixa linear de trabalho). As diferentes concentrações das soluções padrão de trabalho foram preparadas a partir de uma solução estoque de concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os padrões internos foram DANO para CIPRO e ENRO e SQX para SMX e SMZ, respectivamente adicionados na concentração de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ em cada um dos níveis de concentração da curva analítica.

LINEARIDADE E SENSIBILIDADE

A linearidade e a sensibilidade foram calculadas a partir da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados da curva analítica para SMX, CLF, CIPRO, ENRO, OTC, TC, DXC e CTC obtida anteriormente. A linearidade é expressa pelo coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da equação que descreve a curva analítica.

Como critério de aceitação foram avaliados os coeficientes de correlação e os gráficos de resíduos. A ANVISA estipula que coeficiente de correlação linear deva ser igual ou superior a 0,99.

PRECISÃO

Precisão intra-ensaio: foi avaliada mediante análise, no mesmo dia, pelo mesmo equipamento e analista, de cinco soluções contendo todos os antimicrobianos em um nível de concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise em duplicata de três soluções padrões em dois níveis de concentração, $50,0$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, em 5 dias diferentes. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Como critério de aceitação foi adotado um RSD máximo de 5 %, conforme preconizado pela ANVISA, 2003.

EXATIDÃO

A exatidão do método para a determinação de TC, CLF, CIPRO, ENRO e SMX por CE foi avaliada pela comparação do método proposto com os métodos de HPLC da Farmacopéia Americana (USP XXVIII). Os procedimentos estão descritos no item III.4.5.

DETECTABILIDADE

A detectabilidade foi estabelecida a partir da análise de soluções padrão contendo os antimicrobianos em concentrações decrescentes até que a relação sinal ruído fosse igual a 3 (medida no tempo de migração de cada analito). Os valores foram confirmados experimentalmente no equipamento.

ROBUSTEZ

A susceptibilidade do método analítico desenvolvido frente a mudanças foi avaliada mediante o parâmetro robustez. Para este propósito foi utilizado o planejamento experimental 2^3 (ver Tabela III.1 e III.2). As variáveis utilizadas para o grupo A (TC, CTC, DXC e OTC) foram: temperatura (22,2 – 23,8 °C), pH (9,2 – 10,8) e concentração do eletrólito (carbonato 46,6 – 53,4 mmol L⁻¹) e para o grupo B (CLF, DANO, CIPRO, ENRO, SMZ, SMX e SQX) foram pH (8,3 – 8,7), concentração do eletrólito (Fosfato de sódio 58 – 62 mmol L⁻¹) e temperatura (24,3 – 27,7 °C).

Tabela III.1. Valores nominais correspondentes a -1,68, -1, 0, +1, e +1,68 no planejamento experimental 2^3 na avaliação da robustez do método para o grupo A.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A- Concentração de carbonato (mmol L ⁻¹)*	46,6	48	50	52	53,4
B- Temperatura (°C)	22,2	22,5	23	23,5	23,8
C- pH	9,2	9,5	10	10,5	10,8

(*) na presença de 1,0 mmol L⁻¹ EDTA.

Tabela III.2. Valores nominais correspondentes a -1,68, -1, 0, +1, e +1,68 no planejamento experimental 2^3 na avaliação da robustez do método para o grupo B.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A- pH	8,3	8,4	8,5	8,6	8,7
B- Concentração de Fosfato de sódio (mmol L ⁻¹)*	58	59	60	61	62
C- Temperatura (°C)	24,3	25	26	27	27,7

(*) na presença de 1,0 mmol L⁻¹ EDTA.

III.4.4 PROCEDIMENTO DA FARMACOPÉIA AMERICANA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS POR HPLC (USP XXVIII, 2005)

a) TETRACICLINA cápsulas

Solvente de diluição: mistura de 680 mL de oxalato de amônio 0,1 mol L⁻¹ e 270 mL de dimetilformamida.

Fase móvel: misturar 680 mL de oxalato de amônio e 270 mL de dimetilformamida e 50 mL de fosfato dibásico de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Ajustar o pH para 7,6-7,7 com 3 mol L^{-1} de hidróxido de amônio ou ácido fosfórico 3 mol L^{-1} . Filtrar a fase móvel em membrana de $0,5 \mu\text{m}$ de porosidade.

Solução padrão: Pesar uma quantidade exata do padrão analítico de hidrocloreto de tetraciclina e diluir com o solvente de diluição até obter uma concentração de aproximadamente de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Preparo da amostra: Transferir uma massa correspondente a 50 mg de hidrocloreto de tetraciclina, exatamente pesado, para um balão de 100 mL e avolumar com o solvente de diluição.

Sistema cromatográfico: comprimento de onda de 280 nm, coluna analítica C_8 ($4,6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$, $5 \mu\text{m}$) e vazão 2 mL min^{-1} .

b) CLORANFENICOL solução oftálmica

Fase móvel: preparar uma solução de água, metanol e ácido acético glacial (55:45:10 v/v/v).

Solução padrão: dissolver uma quantidade exata do padrão analítico de cloranfenicol em fase móvel e diluir até uma concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Filtrar a fase móvel em membrana de $0,5 \mu\text{m}$ de porosidade.

Sistema cromatográfico: comprimento de onda de 280 nm, coluna analítica C_{18} ($4,6 \text{ mm} \times 10 \text{ cm}$, $5 \mu\text{m}$), vazão 1 mL min^{-1} .

Solução amostra: Transferir um volume de solução oftálmica, equivalente a 50 mg de cloranfenicol em 100 mL de fase móvel. Transferir 5 mL desta solução para um balão de 25 mL e diluir com fase móvel e filtrar em membrana de $0,5 \mu\text{m}$.

c) CIPROFLOXACINA comprimidos

Fase móvel: Preparar, filtrar e desgaseificar uma mistura de ácido fosfórico $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH a $3,0 \pm 0,1$ (pH previamente ajustado com trietilamina) e acetonitrila (87:13 v/v).

Solução padrão: Dissolver uma quantidade exatamente pesada do padrão de hidrocloreto de ciprofloxacina com fase móvel até obter uma concentração de, aproximadamente, $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$.

Preparo da amostra: Transferir uma quantidade de volume da amostra injetável equivalente a 25 mg de ciprofloxacina, em um volume de 100 mL, diluído em fase móvel.

Sistema Cromatográfico: comprimento de onda de 278 nm, coluna C_{18} (4 mm x 25 cm, $5 \mu\text{m}$), temperatura: $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. O tempo de retenção da ciprofloxacina deve se situar no intervalo de 6,4 a 10,8 min.

e) SULFAMETOXAZOL suspensão oral

Fase móvel: misturar 1400 mL de água, 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina em um balão de 2000 mL. Ajustar com hidróxido de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ou ácido acético (1:100 v/v) a pH $5,9 \pm 0,1$. Avolumar com água e filtrar em membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

Solução padrão: dissolver uma quantidade exata de sulfametoxazol em metanol e diluir com metanol até obter uma concentração de $0,32 \text{ mg mL}^{-1}$. Transferir 5 mL desta solução para um balão de 50 mL e avolumar com a fase móvel.

Solução amostra: transferir uma quantidade em volume da suspensão oral, equivalente a 80 mg de sulfametoxazol em um balão de 50 mL com 30 mL de metanol, sonicar por 10 minutos. Em seguida diluir com metanol a volume, misturar e centrifugar. Utilizar 5 mL do sobrenadante e colocar em outro balão de 50 mL e diluir com a fase móvel e filtrar em membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

Sistema cromatográfico: comprimento de onda de 254 nm, coluna analítica C_{18} ($3,9 \text{ mm} \times 30 \text{ cm}$, $5 \mu\text{m}$), vazão 2 mL min^{-1} .

f) SULFAMETOXAZOL comprimidos

Fase móvel: misturar 1400 mL de água, 400 mL de acetonitrila e 2 mL de trietilamina em um balão de 2000 mL. Ajustar com hidróxido de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ou ácido acético (1:100 v/v) a pH $5,9 \pm 0,1$. Diluir com água até volume e filtrar em membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

Solução padrão: dissolver uma quantidade exata de sulfametoxazol em metanol e diluir com metanol até obter uma concentração de $0,32 \text{ mg mL}^{-1}$. Transferir 5 mL desta solução para um balão de 50 mL e avolumar com a fase móvel.

Solução amostra: Pesar a massa de não menos de 20 comprimidos previamente triturados e homogeneizados. Transferir uma porção exatamente pesada, equivalente a 160 mg do sulfametoxazol para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 50 mL de metanol e sonicar por 5 minutos, diluir com metanol até volume, misturar e filtrar. Transferir 5 mL do filtrado para um balão de 50 mL, diluir com fase móvel até volume e misturar.

Sistema cromatográfico: comprimento de onda de 254 nm, coluna analítica C_{18} (3,9 mm x 300 mm, 5 μm), vazão de 2 mL min^{-1} .

III.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ELETROFORÉTICO

Inicialmente foram empregados antimicrobianos das famílias das fluoroquinolonas (DANO, CIPRO e ENRO), beta-lactâmicos (AMOX, PEN e AMP), sulfonamidas (SMX, SQX e SMZ), cloranfenicol e tetraciclinas (OTC, TC e CTC) para avaliar uma possível separação destes compostos por CE-DAD em uma única corrida, com o objetivo de realizar a determinação de resíduos de antimicrobianos em leite e quantificação em fármacos.

III.5.1.1 ESTUDOS PRELIMINARES DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA SEPARAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS

As condições iniciais selecionadas para a separação dos antimicrobianos por CE foram baseadas nas condições recomendadas por CHEN & GU (1995), para a determinação de tetraciclinas em leite: eletrólito de trabalho, 50 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio + 50 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio + 1 mmol L⁻¹ de EDTA + 10 mmol L⁻¹ dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 8,5; voltagem, 13 kV e temperatura de 23 °C. No entanto, essas condições não foram adequadas para a separação de todos os antimicrobianos de interesse e estudos adicionais se fizeram necessários. Os estudos preliminares foram conduzidos no sentido de permitir a separação do maior número possível de antimicrobianos em uma única corrida e, para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: composição do eletrólito, pH e temperatura.

Nos estudos de eletroforese capilar foi empregada a configuração de polaridade normal conforme esquematizado na Figura III.1. O ânodo fica posicionado próximo ao sistema de introdução de amostra e o cátodo após o detector.

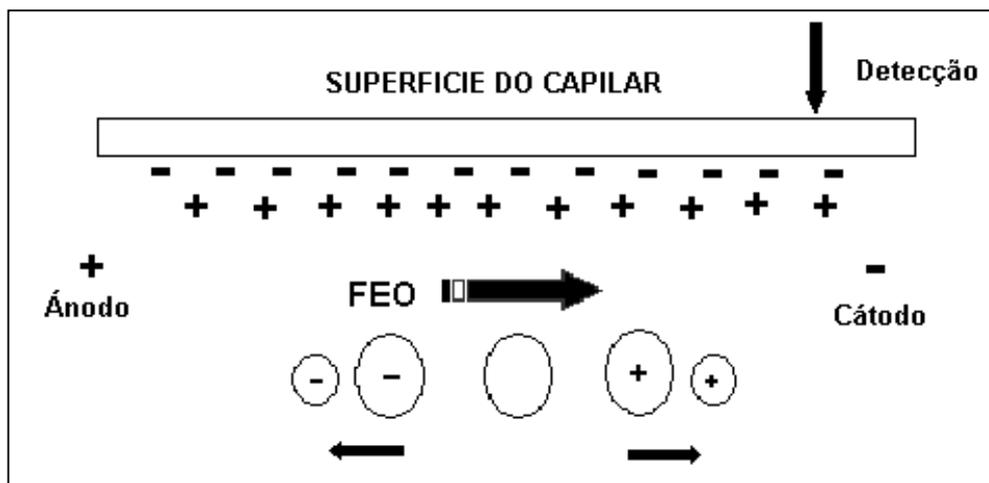


Figura III.1 Mobilidade dos analitos segundo as cargas e massas. EOF: fluxo eletroosmótico.

Quando se aplica uma elevada diferença de potencial pelo capilar de sílica, gera-se um fluxo eletroosmótico (EOF) causando a migração do solvente do ânodo para o cátodo. A velocidade total das moléculas é a soma das velocidades do EOF e de migração eletroforética, decorrente da migração do íon no campo elétrico. No entanto, o EOF é maior do que a velocidade de migração eletroforética dos íons individuais e, portanto, mesmo que os analitos migrem ao longo do capilar em função de suas cargas, o EOF é suficientemente alto para transportar todas as espécies (ânions, neutros e cátions) para uma mesma extremidade do capilar, onde é posicionado o sistema de detecção.

Os analitos que se encontram negativamente ionizados irão apresentar tempos de migração maior do que os neutros e esses, por sua vez, maiores do que os ionizados positivamente.

Assim como o EOF é influenciado pelo pH devido a dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução, a migração eletroforética também depende do pH do eletrólito de corrida, uma vez que a ionização das moléculas depende do equilíbrio ácido-base. A completa ionização é conseguida quando o pH do eletrólito estiver duas unidades de pH acima ou abaixo do valor de pKa, para compostos ácido

e básicos, respectivamente. Assim sendo, pela escolha do pH é possível otimizar a separação dos analitos.

Enquanto as sulfonamidas são ácidos fracos e o cloranfenicol é uma base, as fluoroquinolonas e tetraciclinas têm caráter anfótero.

Ainda no sentido de encontrar um eletrólito que permitisse a separação de um maior número possível de antimicrobianos, foram realizados estudos de pH na faixa de 7,5-11, com exceção do acetato, que foi de 4,5, e concentração do eletrólito na faixa de 20-140 mmol L⁻¹. Possivelmente, as diferenças nas estruturas químicas dos compostos e dos diferentes pKa não foi possível separar todos os antimicrobianos em uma única corrida sem comprometer o tempo de análise, uma vez que a separação na CE é dependente da carga e do tamanho dos compostos.

Em um outro estudo foi avaliada a influência da temperatura sobre a separação de antimicrobianos da família dos beta-lactâmicos. Na Figura III.2 estão apresentados os eletroferogramas para a separação de AMP, AMOX e PEN em três temperaturas diferentes (16, 20 e 23 °C). Observa-se que o tempo de migração dos compostos aumenta com a diminuição da temperatura. Este parâmetro, junto com a voltagem devem ser levados em consideração no desenvolvimento do método para evitar o efeito Joule (geração de calor). O efeito Joule é devido à passagem de corrente elétrica pela solução, podendo levar ao alargamento de bandas e perda da resolução. O efeito Joule pode ser minimizado através do controle da voltagem, concentração do eletrólito e temperatura (SANTOS e cols., 2000). No entanto, a viscosidade do meio deve ser considerada, por que ela pode influenciar também no tempo de migração dos analitos em função da temperatura. Quanto maior a temperatura menos viscosidade e menor tempo de migração.

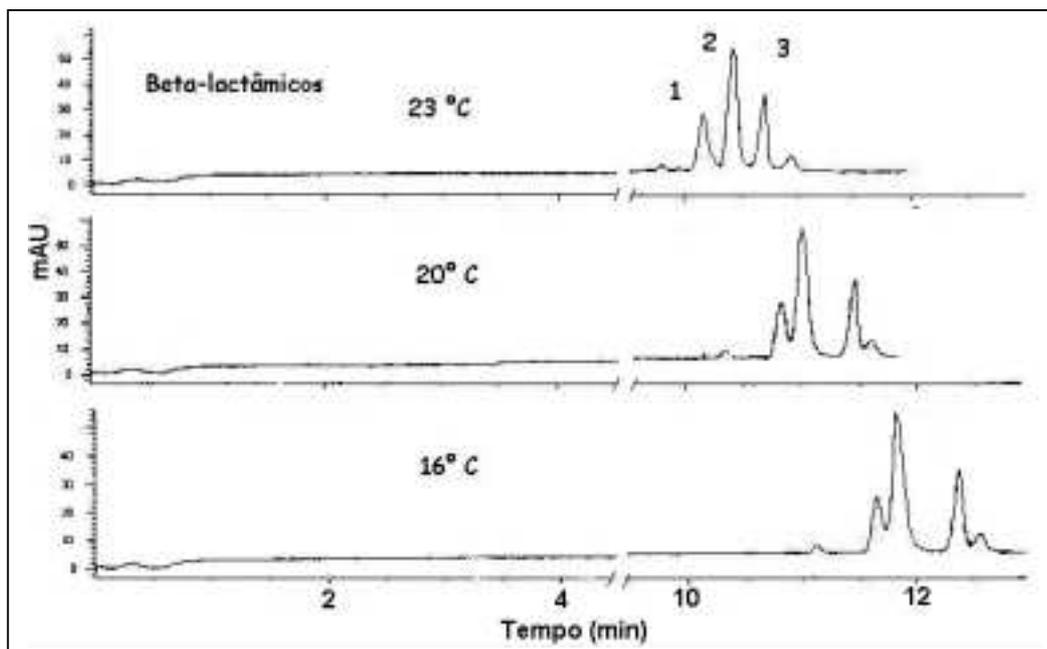


Figura III.2 Eletroferograma de (1) AMP, (2) AMOX e (3) PEN 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em diferentes temperaturas. Eletrólito fosfato/tetraborato 100/20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , 13 kV, pH 8,5, λ 203 nm.

Fez-se necessária a incorporação do EDTA 1 mmol L^{-1} no eletrólito de corrida, para prevenir a interferência de íons metálicos na separação, no caso particular, das tetraciclina. A adição do EDTA ao eletrólito aumenta a separação e resolução das tetraciclina, assim como diminui o tempo de migração destas. A finalidade do EDTA é de evitar a interação das tetraciclina com metais tais como Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , entre outros, através da complexação.

Em todos os estudos realizados foi adicionado o EDTA aos eletrólitos em vista que o objetivo era poder utilizar o mesmo eletrólito para a separação de vários antimicrobianos na mesma corrida e evitar as possíveis reações de complexação com os metais presentes na matriz.

Em diversos estudos na literatura que têm focado a determinação de antimicrobianos por CE, os autores recomendam como eletrólito o uso do Fosfato de sódio, tetraborato de sódio, acetato de sódio, tris, carbonato de sódio, mistura fosfato de sódio e tetraborato de sódio, entre outros, além do uso de surfactante para a

formação das micelas, como por exemplo, o SDS (TAVARES & McGUFFIN, 1994; LIN e col., 1997b; CASTELLANOS e col., 2000; HERNANDEZ e col., 2002). Nas Figuras III.3 a III.8, estão apresentados alguns dos eletroferogramas obtidos em diferentes eletrólitos de trabalho avaliados.

A concentração de fosfato de sódio de 140 mmol L^{-1} foi a melhor para a determinação dos beta-lactâmicos em comparação com as outras concentrações. As fluoroquinolonas e tetraciclinas foram separadas neste eletrólito. A ENRO e TC apresentaram o mesmo tempo de migração, o que representaria um problema de co-eluição destes analitos em uma única corrida. No eletrólito Fosfato de sódio 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5 (Figura III.3), é possível a separação dos antimicrobianos de uma mesma família. No entanto, nessas condições de análise verifica-se também que a ENRO e a TC apresentam tempos de migração muito próximos, o que inviabilizaria a determinação simultânea de todos os antimicrobianos em uma única corrida, objetivo principal deste trabalho.

Utilizando eletrólito tetraborato 100 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, verifica-se novamente que é possível a separação de antimicrobianos da mesma família, exceto para CTC e DXC (Figura III.4). No entanto, também neste eletrólito ocorre co-eluição de antimicrobianos de famílias diferentes, como é o caso para os beta-lactâmicos e as tetraciclinas.

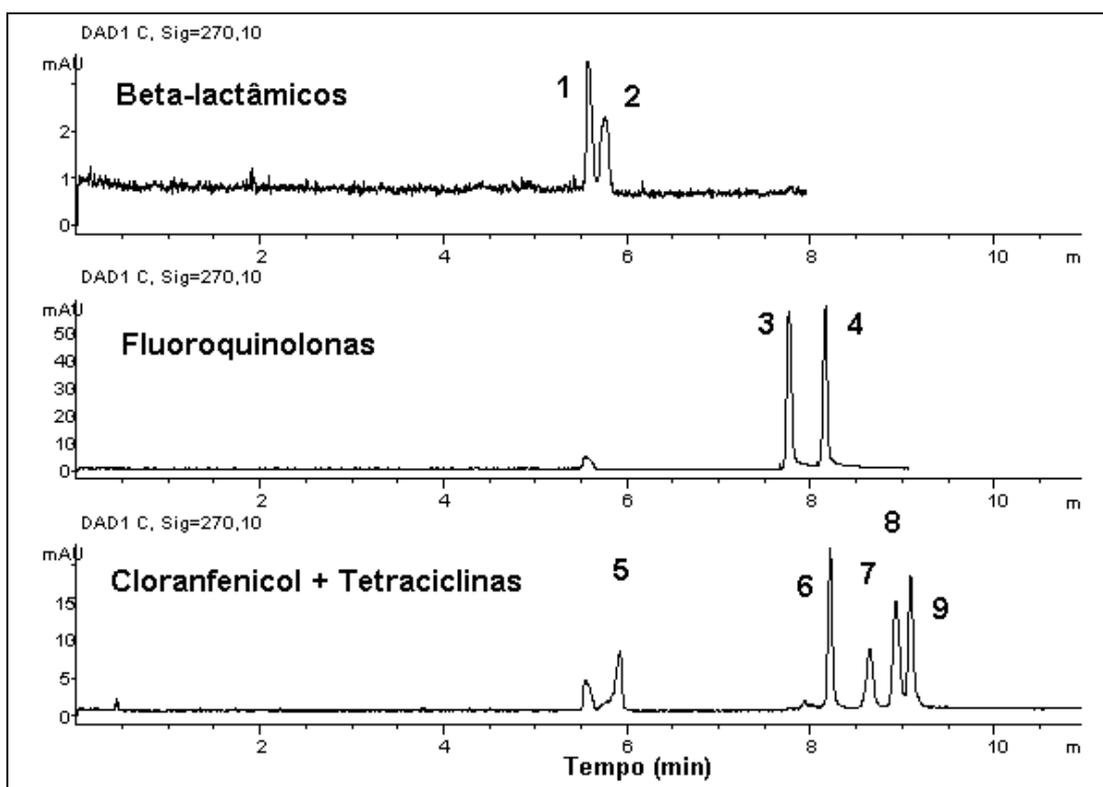


Figura III.3 Eletroferogramas, utilizando eletrólito Fosfato de sódio 140 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, na separação de (1) AMP (t_m 5,6 min), (2) AMOX (t_m 5,8 min), (3) CIPRO (t_m 7,8 min), (4) ENRO (t_m 8,1 min), (5) CLF (t_m 5,9 min), (6) TC (t_m 8,2 min), (7) OTC (t_m 8,6 min) e (8) CTC (t_m 8,9 min), (9) DXC (t_m 9,1 min). Concentração dos antimicrobianos: $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, voltagem: 13 kV, temperatura: $23 \text{ } ^\circ\text{C}$ e λ : 270 nm.

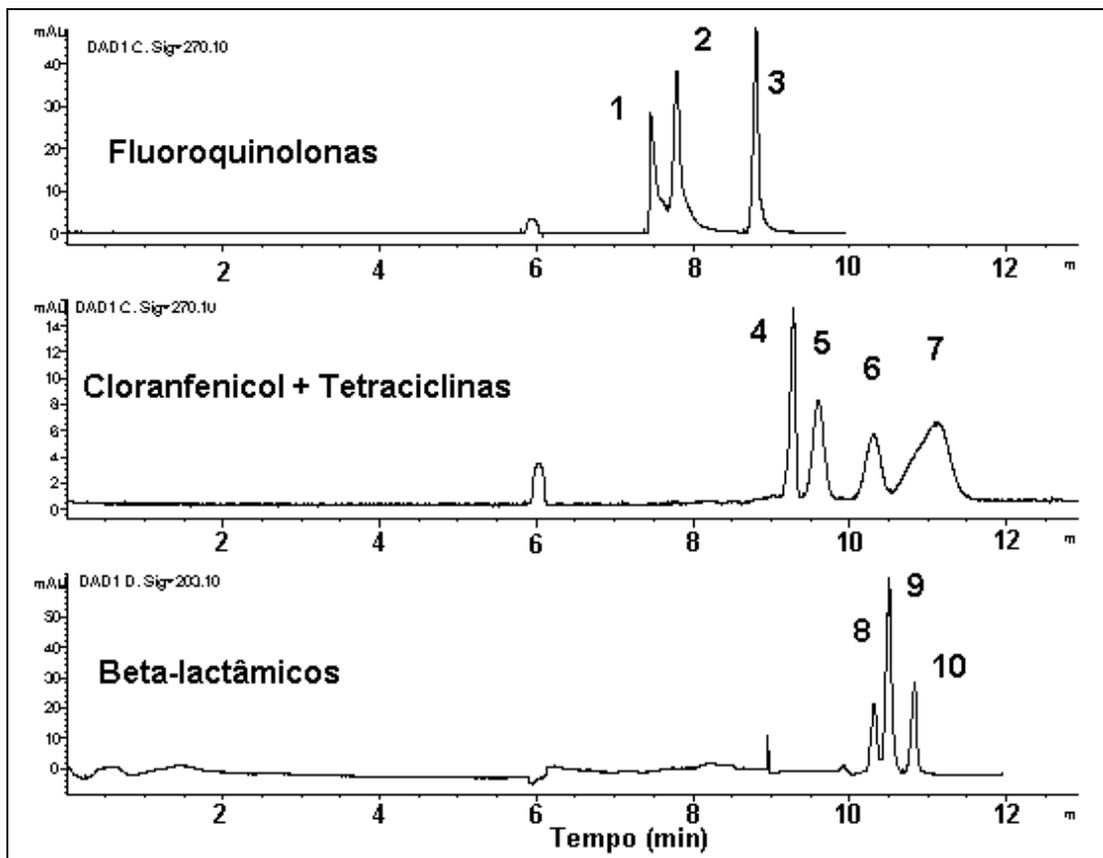


Figura III.4 Eletroferogramas, utilizando eletrólito tetraborato 100 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, (1) DANO (t_m 7,4 min), (2) CIPRO (t_m 7,8 min), (3) ENRO (t_m 8,8 min), (4) CLF (t_m 9,3 min), (5) TC (t_m 9,6 min), (6) OTC (t_m 10,3 min), (7) CTC/DXC (t_m 11,2 min), (8) AMP (t_m 10,3 min), (9) AMOX (t_m 10,6 min) e (10) PEN (t_m 10,8 min). Concentração dos antimicrobianos: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, voltagem: 13 kV, temperatura: $23 \text{ }^\circ\text{C}$, λ : 203 nm (beta-lactâmicos), λ : 270 nm (fluoroquinolonas, CLF, tetraciclina).

Como não seria possível a separação de todos os antimicrobianos no eletrólito tetraborato, foram realizados estudos adicionais empregando o tris como eletrólito (Figura III.5). Nestas condições foi verificado que as fluoroquinolonas não apresentaram resolução adequada, assim como a CTC e a DXC apresentaram o mesmo tempo de migração. Ainda, foi observado que a SQX elui em tempo de migração próximo ao TC. Sendo assim, o eletrólito tris também não permitiu a separação de todos os antimicrobianos em estudo.

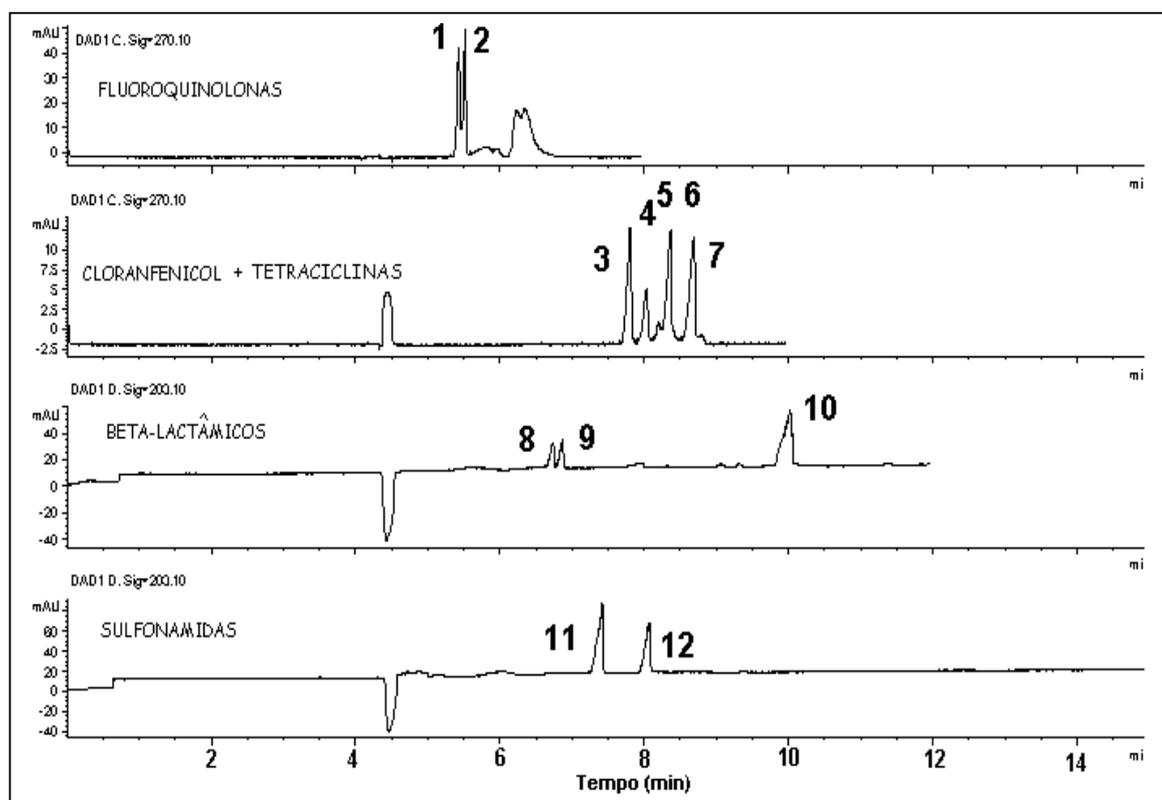


Figura III.5 Eletroferogramas, utilizando eletrólito tris 100 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 11, (1) DANO (t_m 5,4 min), (2) CIPRO (t_m 5,5 min), (3) CLF (t_m 7,8 min), (4) TC (t_m 8,0 min), (5) OTC (t_m 8,4 min), (6) CTC (t_m 8,7 min), (7) DXC (t_m 8,7 min), (8) AMP (t_m 6,7 min), (9) AMOX (t_m 6,9 min), (10) PEN (t_m 10,0 min), (11) SMZ (t_m 7,4 min) e (12) SQX (t_m 8,1 min). Concentração dos antimicrobianos: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, voltagem: 13 kV, temperatura: $23 \text{ }^\circ\text{C}$, λ : 203 nm (beta-lactâmicos, sulfonamidas), λ : 270 nm (fluoroquinolonas, CLF, tetraciclina).

Em continuação, e tendo em vista a busca de um eletrólito que permitisse a separação de um maior número possível de antimicrobianos, foi avaliado o eletrólito carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 11. Os eletroferogramas correspondentes estão apresentados na Figura III.6.

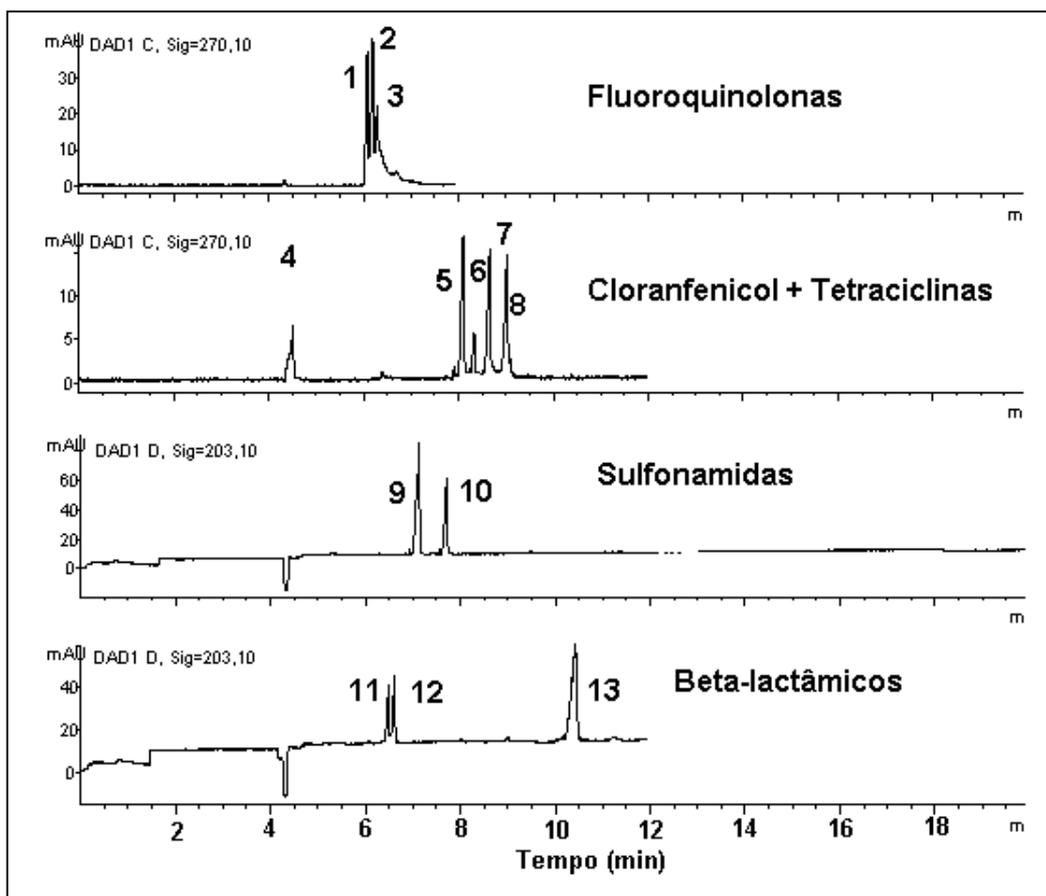


Figura III.6 Eletroferogramas, utilizando eletrólito carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 11, (1) DANO (t_m 6,0 min), (2) CIPRO (t_m 6,1 min), (3) ENRO (t_m 6,3 min), (4) CLF (t_m 4,5 min), (5) TC (t_m 8,1 min), (6) OTC (t_m 8,3 min), (7) CTC (t_m 8,7 min) e (8) DXC (t_m 9,0 min), (9) SMZ (t_m 7,1 min), (10) SQX (t_m 7,7 min), (11) AMP (t_m 6,4 min), (12) AMOX (t_m 6,6 min) e (13) PEN (t_m 10,4 min). Concentração dos antimicrobianos: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, voltagem: 13 kV, temperatura: $23 \text{ }^\circ\text{C}$. λ : 203 nm (beta-lactâmicos, sulfonamidas), λ : 270 nm (fluoroquinolonas, CLF, tetraciclinas).

Com o eletrólito carbonato de sódio + EDTA foi observado que as tetraciclinas, CLF e sulfonamidas apresentaram adequada separação entre eles, o que não aconteceu para as fluoroquinolonas e beta-lactâmicos.

Outro eletrólito avaliado foi uma mistura de fosfato/tetraborato 20/100 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, cujos eletroferogramas estão apresentados na Figura III.7.

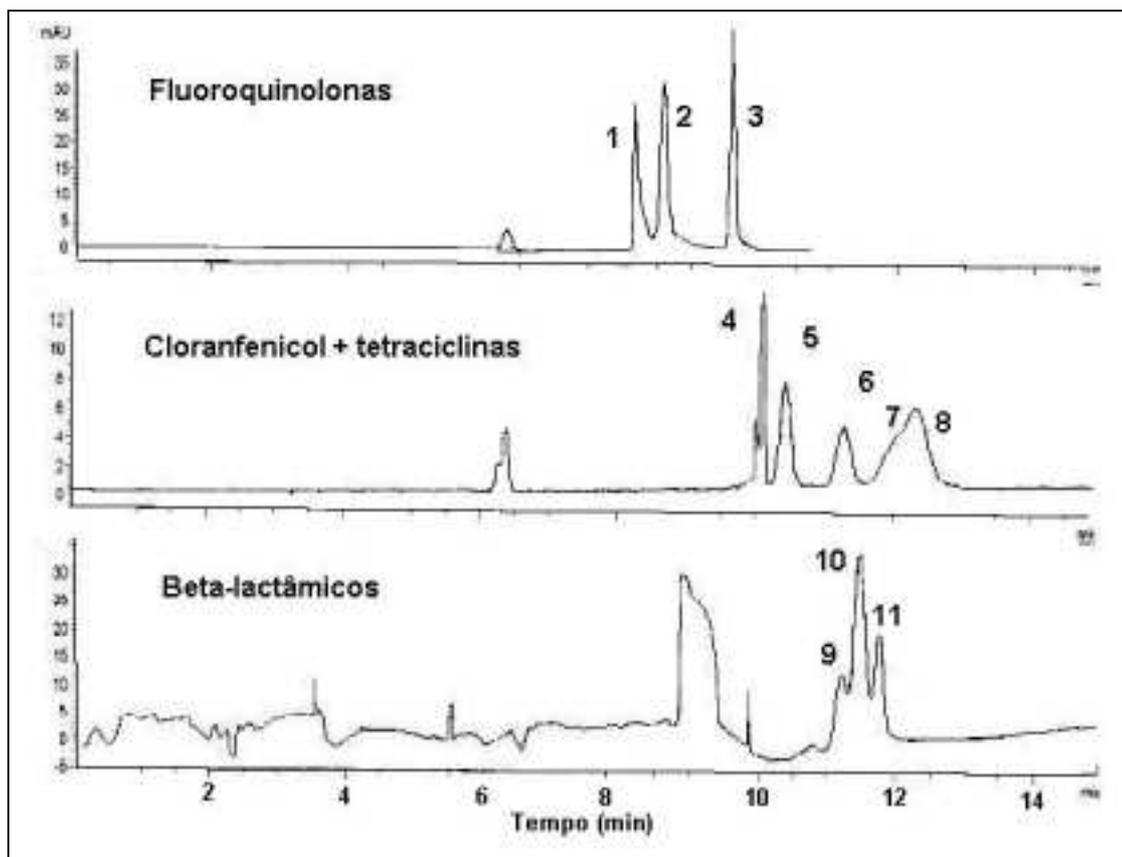


Figura III.7 Eletroferogramas, utilizando eletrólito fosfato/tetraborato 20/100 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5 (1) DANO (t_m 8,1 min), (2) CIPRO (t_m 8,6 min), (3) ENRO (t_m 9,6 min), (4) CLF (t_m 10,1 min), (5) TC (t_m 10,4 min), (6) OTC (t_m 11,3 min), (7) CTC (t_m 12,3 min), (8) DXC (t_m 12,3 min), (9) AMP (t_m 11,2 min), (10) AMOX (t_m 11,4 min) e (11) PEN (t_m 11,7 min). Concentração dos antimicrobianos: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, voltagem: 13 kV, temperatura: 23 °C. λ : 203 nm (beta-lactâmicos, sulfonamidas), λ : 270 nm (fluoroquinolonas, CLF, tetraciclinas).

Neste eletrólito, composto por fosfato de sódio e tetraborato foi possível, dentro de uma mesma família, apenas a separação das fluoroquinolonas foi atendida. As tetraciclinas, além de apresentaram uma resolução não adequada entre elas, a DXC e CTC co-migraram no mesmo tempo. Ainda, os beta-lactâmicos eluíram no mesmo tempo que as tetraciclinas.

Outro eletrólito avaliado foi uma mistura de fosfato/tetraborato 100/20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5. Os eletroferogramas estão apresentados na Figura III.8.

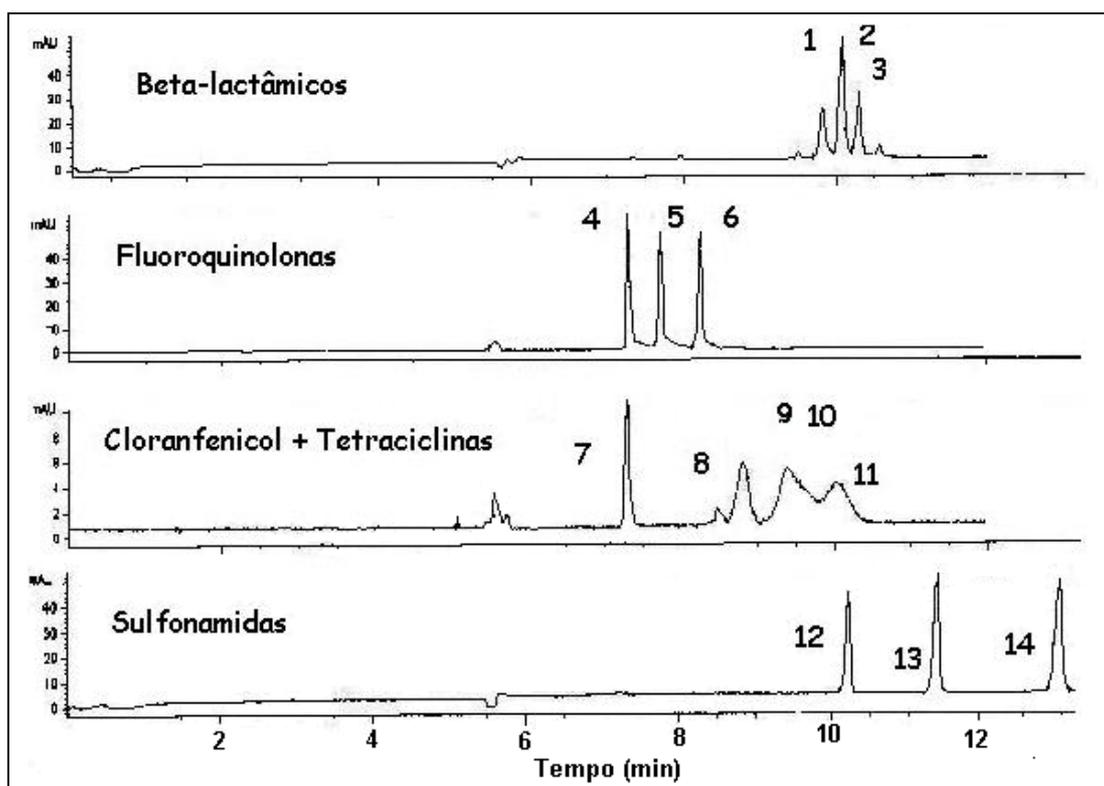


Figura III.8 Eletroferogramas, utilizando eletrólito fosfato/tetraborato 100/20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, (1) AMP (t_m 9,8 min), (2) AMOX (t_m 10,0 min) e (3) PEN (t_m 10,3 min), (4) DANO (t_m 7,3 min), (5) CIPRO (t_m 7,7 min), (6) ENRO (t_m 8,3 min), (7) CLF (t_m 7,3 min), (8) TC (t_m 8,8 min), (9) OTC (t_m 9,4 min), (10) CTC (t_m 9,6 min), (11) DXC (t_m 10,0 min), (12) SMZ (t_m 10,2 min), (13) SQX (t_m 11,4 min) e (14) SMX (t_m 12,9 min). Concentração dos antimicrobianos: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, voltagem: 13 kV, temperatura: 23 °C. λ 203 nm (beta-lactâmicos, sulfonamidas), λ 270 nm (fluoroquinolonas, CLF, tetraciclinas).

No eletrólito fosfato/tetraborato 100/20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, foi verificada a separação dos antimicrobianos dentro de uma mesma família, para as fluoroquinolonas, beta-lactâmicos e sulfonamidas. As tetraciclinas não apresentaram resolução adequada e a OTC e CTC co-eluem. Embora se tenha alcançado boa separação e resolução dos picos, também este eletrólito não poderia ser usado para a determinação de todos os analitos em uma única corrida.

Muitos outros eletrólitos foram avaliados e os resultados estão sumarizados na Tabela III.3. A separação dentro de uma mesma família é sinalizada por (+) e a não separação por (-). No caso do CLF, como não foram avaliados outros antimicrobianos da família dos afenicóis, foi avaliada a separação entre o analito que apresentasse tempo de retenção mais próximo.

Tabela III.3 Estudo univariado do eletrólito na separação dos antimicrobianos TC, OTC, CTC, DXC, CLF, DANO, CIPRO, ENRO, AMOX, AMP, PEN, SMX, SMZ e SQX.

Eletrólito 23 °C, 13 kV	Conc. mmol L⁻¹	TC(4)	CLF	FQs(3)	β-Lacs(3)	Sulfas(3)
Fosfato, pH 8,5	60	-	-	+	-	nf
	100	-	-	+	-	nf
	120	+	-	+	-	nf
Tetraborato, pH 8,5	20	-	+	-	-	nf
	60	-	+	-	-	nf
	100	-	+	-	+	nf
Acetato pH 4,5	60	-	-	-	-	nf
	100	-	-	-	-	nf
	140	-	-	-	-	nf
Tris pH 11	60	-	+	-	-	-
	100	-	+	-	+	-
	140	-	+	nf	-	nf
Carbonato pH 11	60	+	-	-	+	-
	100	-	-	-	+	-
	120	-	-	-	+	+
Fosfato/Tetrab orato pH 8,5	20/20	-	+	-	+	
	20/40	-	+	+	+	+
	20/60	-	+	-	-	nf
	20/100	-	-	+	-	nf
	40/40	-	+	+	-	nf
	40/60	-	+	-	+	nf
	50/50	-	+	-	+	nf
	60/40	-	+	+	+	+
	80/20	-	+	+	+	+

TC: tetraciclina (TC, OTC, CTC, DXC), CLF: cloranfenicol, FQs: fluoroquinolonas (DANO, CIPRO, ENRO), β-Lacs: beta-lactâmicos (AMP, AMOX, PEN), sulfas:sulfonamidas (SMZ,SMX, SQX). (+) separação dos analitos de uma mesma família, (-) não houve separação dos analitos de uma mesma família, nf: ensaio não feitos.

Os estudos univariados realizados, cujos resultados estão apresentados na Tabela III.3, nos mostram que não se conseguiu separar todas as famílias de antimicrobianos numa mesma corrida eletroforética, mas sim entre antimicrobianos de uma mesma família. Devido a isto, optou-se por usar dois diferentes eletrólitos de trabalho.

O carbonato foi eletrólito de melhores resultados para separar satisfatoriamente todos os analitos da família das tetraciclinas. Para estudos posteriores, as tetraciclinas foram denominadas de Grupo A. Para refinar e otimizar as condições de análise um planejamento experimental foi realizado.

Para o caso das sulfonamidas, cloranfenicol e fluoroquinolonas, foi possível a separação dos analitos dentro de uma família e entre elas em uma mesma corrida com o eletrólito fosfato/tetraborato nas concentrações de 60/40 mmol L⁻¹ e 80/20 mmol L⁻¹. Pelo mesmo motivo anteriormente explicitado, foi escolhido o eletrólito de trabalho de menor concentração, fosfato/tetraborato 60/40 mmol L⁻¹. Também para estes antimicrobianos, denominados de grupo B, foi realizado um planejamento experimental para a otimização do método.

Dos estudos preliminares univariados se concluiu que o melhor eletrólito para o grupo das tetraciclinas é o carbonato de sódio mais EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 11 e a mistura Fosfato de sódio+ tetraborato mais EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, para os demais grupos dos antimicrobianos (sulfonamidas, fluoroquinolonas e CLF). Embora tenha sido possível também a separação dos beta-lactâmicos, estes foram excluídos dos estudos subseqüentes, uma vez que se pretendia inicialmente aplicar a metodologia na matriz leite, e o LMR (4 µg mL⁻¹) destes compostos para esta matriz é muito menor do que para os demais antimicrobianos, e a CE não teria detectabilidade adequada.

O detector utilizado foi o DAD e o comprimento de onda foi selecionado de acordo com o máximo de absorbância para cada família de antimicrobianos (270 nm para tetraciclinas e fluoroquinolonas e 203 nm para sulfonamidas e cloranfenicol). Na Figura III.9, se apresentam os espectros por família dos antimicrobianos.

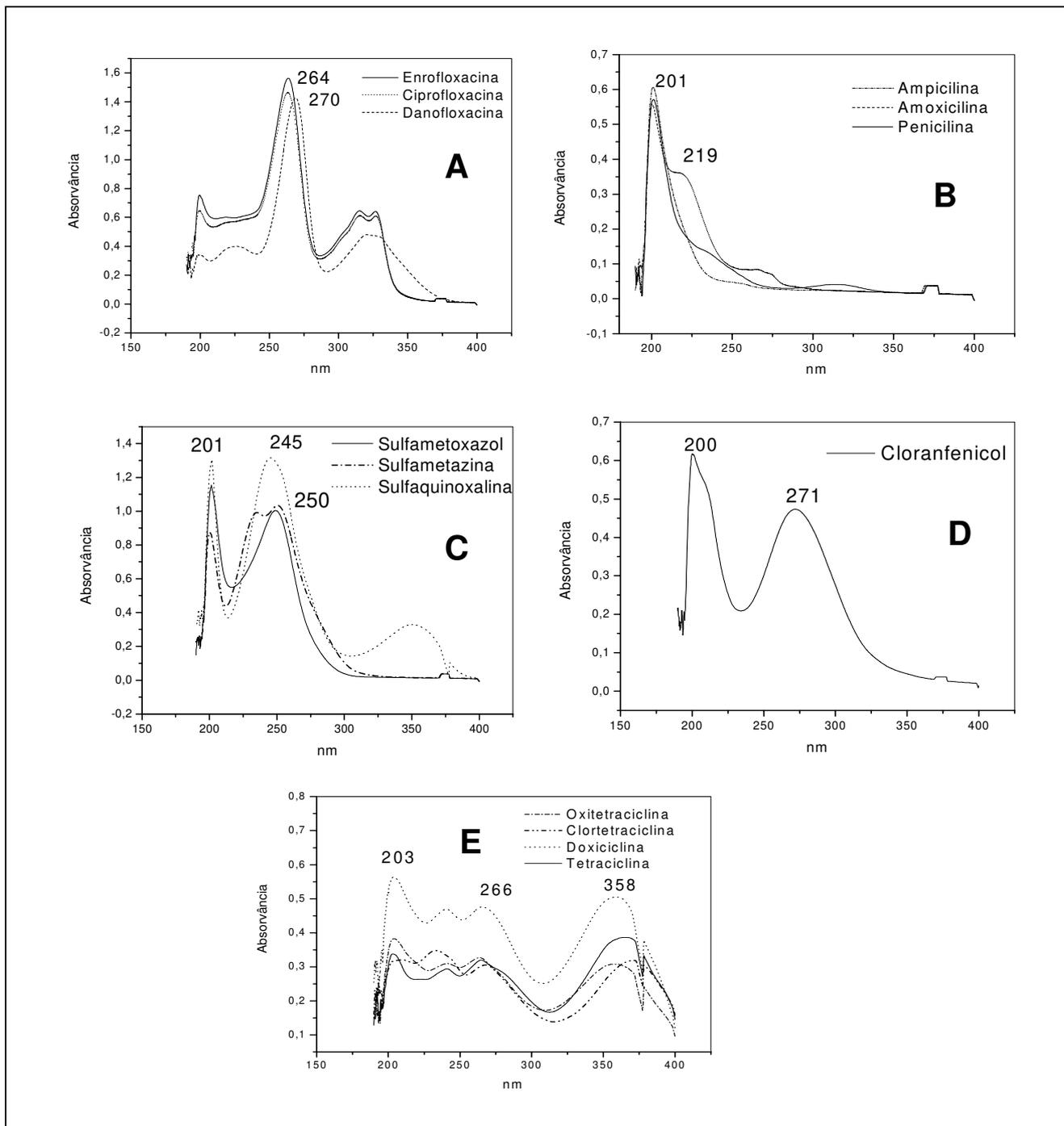


Figura III.9 Espectros UV-Vis dos analitos em estudo. A: fluoroquinolonas; B: beta-lactâmicos; sulfonamidas; D: cloranfenicol e E: tetraciclina.

Uma vez selecionada a composição do eletrólito, foi realizado um estudo teórico da mobilidade eletroforética em função do pH para verificar se o pH selecionado nos estudos preliminares a partir dos resultados experimentais levaria a uma condição ótima de separação dos antimicrobianos.

Cálculo das mobilidades eletroforéticas

A mobilidade eletroforética (μ) é a taxa de migração observada (v) dividida pela magnitude do campo elétrico aplicado (E) em um determinado meio.

A mobilidade eletroforética é máxima quando os analitos se encontram completamente ionizados, zero quando os analitos se encontram em forma neutra e intermédia quando o pH se encontra perto do valor do pKa (BARRÓN e cols., 2001). A mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um analito é dada pela somatória das mobilidades eletroforéticas (μ_j) de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicados pela distribuição ou fração de dissociação das espécies (χ_j), conforme Equação III.1.

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \mu_j \chi_j \quad \text{Equação III.1}$$

A fração de dissociação de cada espécie é calculada a partir das constantes de dissociação ácido-base e dos equilíbrios químicos envolvidos. Os valores de pKa (Tabela III.4) e os equilíbrios de dissociação ácido-base para todos os antimicrobianos em estudo são abordados a seguir.

Tabela III.4 Valores teóricos dos pKa dos antimicrobianos

Composto	pKa1	pKa2	pKa3	pKa4
SMX ^a	5,6	-	-	-
SQX ^a	5,5	-	-	-
SMZ ^a	7,4	-	-	-
CLF ^b	11,0	-	-	-
OTC ^c	3,6	7,5	9,4	10,5
TC ^c	3,4	7,4	9,6	12,1
CTC ^c	3,6	7,5	9,9	10,4
DANO ^d	6,1	8,6	-	-
CIPRO ^d	5,86	8,2	-	-
ENRO ^d	5,88	7,7	-	-

^aLIN e cols., 1997a; ^bMORIGUCHI, e cols, 1994; ^cTAVARES & MCGUFFIN, 1994, ^dBARRON e cols., 2001;.

Cabe mencionar que para as tetraciclinas, de modo geral (Figura III.10), o grupo ácido que lhe confere o pKa de aproximadamente 3 é o grupo hidroxila do anel A. A segunda dissociação (pKa de aproximadamente 7) é devido ao sistema dicarbonila entre o anel B e C. A terceira dissociação ocorre devido a perda de um próton do grupo dietilamino no anel A e a última ionização ácido-base ocorre no grupo fenólico do anel D (TAVARES & MCGUFFIN, 1994).

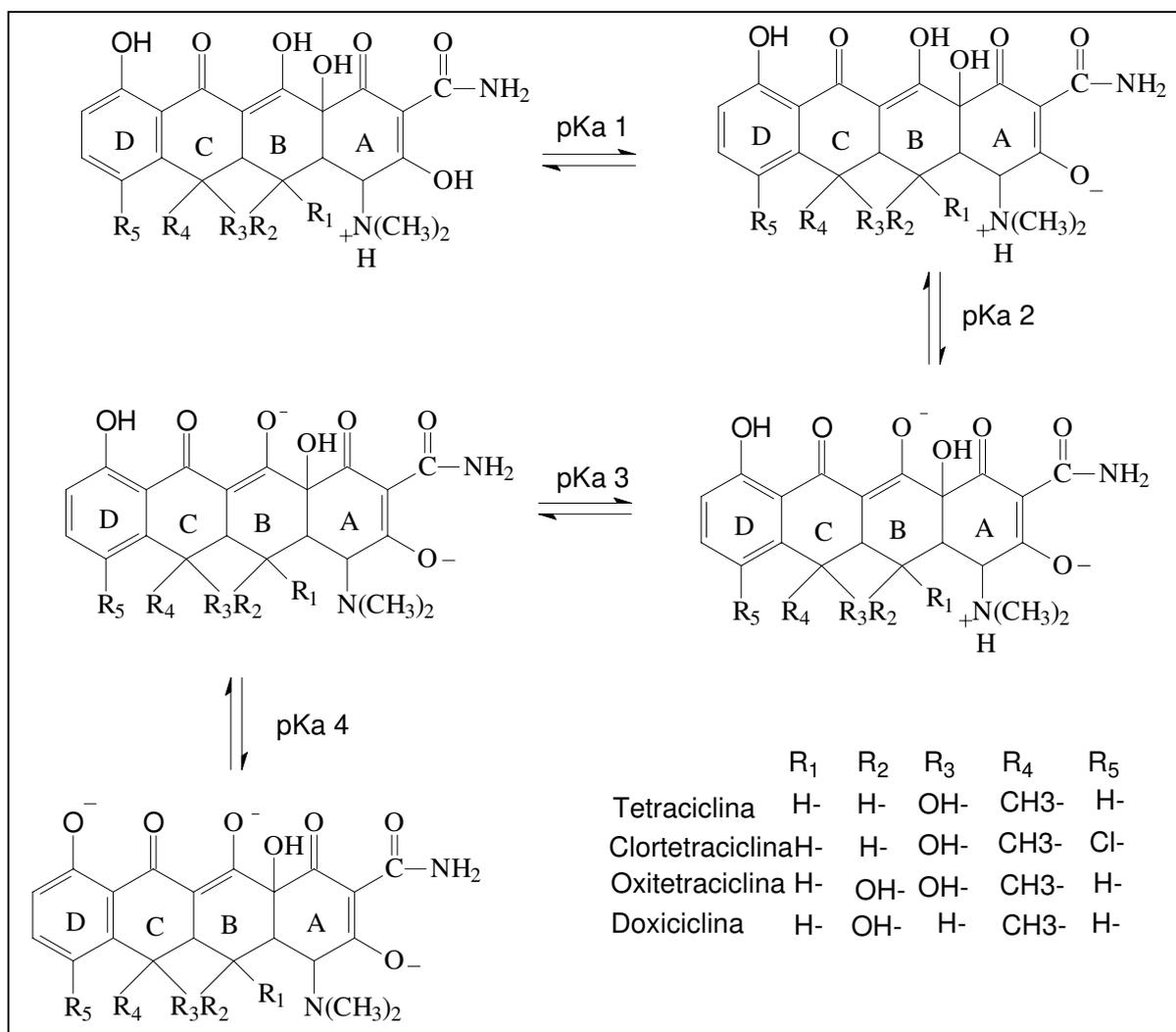


Figura III.10 Equilíbrios ácido - base para as tetraciclínas.

As fluoroquinolonas (Figura III.11) apresentam duas constantes de dissociação, a primeira devido à perda de um próton do grupo carbonila e a segunda atribuída á desprotonação do nitrogênio do anel piperazinila.

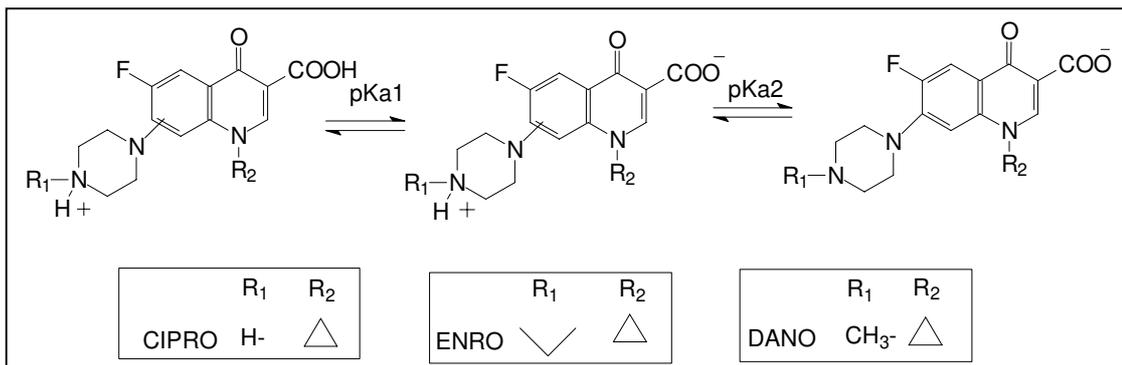


Figura III.11. Equilíbrios ácido - base para as fluoroquinolonas.

Na família das sulfonamidas (Figura III.12), em meio aquoso, ocorre a desprotonação da amina secundária no meio básico.

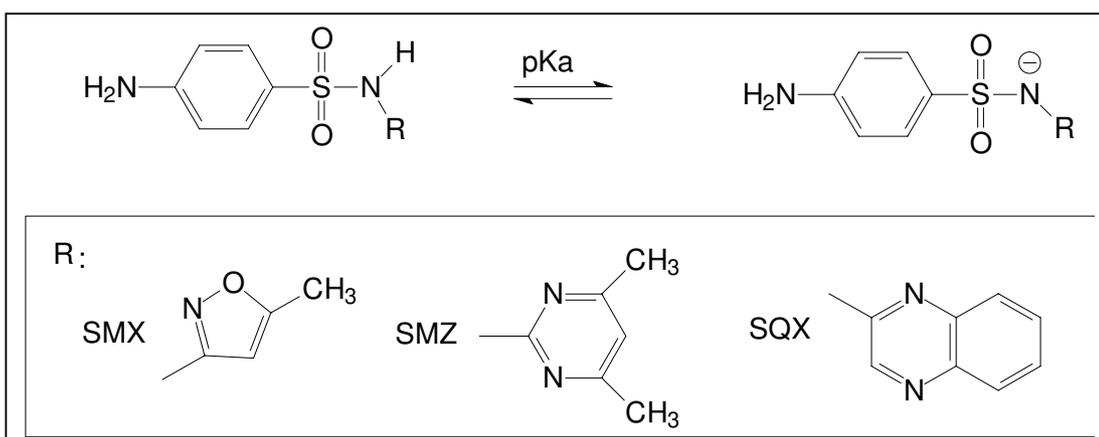


Figura III.12 Equilíbrio ácido - base para as sulfonamidas.

No caso do CLF (Figura III.3), a desprotonação ocorre no carbono alfa da carbonila, o qual está ligado a dois átomos de cloro.

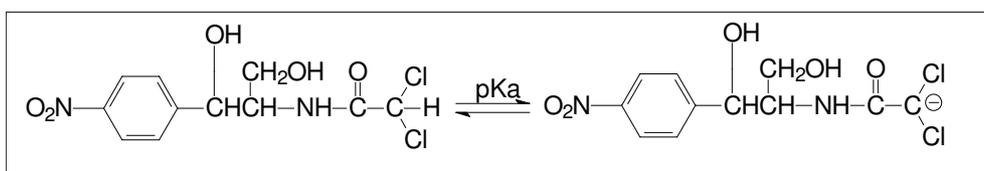


Figura III.13 Equilíbrio ácido - base para cloranfenicol.

Para simplificar, os equilíbrios ácido-base e as espécies envolvidas estão resumidas na Tabela III.5, onde H_nZ representa a espécie não dissociada e H_nZ^- a espécie dissociada. As espécies protonadas são representadas por H_nZ^+ .

Tabela III.5 Equilíbrios de dissociação e mobilidades efetivas dos antimicrobianos em estudo.

SULFONAMIDAS E CLORANFENICOL	
Equilíbrio	$HZ \rightleftharpoons Z^- + H^+$
ácido-base	Ka_1
μ_{ef}	$\mu_{ef} = \mu_{HZ} \chi_{HZ} + \mu_{z^-} \chi_{z^-}$ $\mu_{ef} = \mu_{z^-} \chi_{z^-}$
FLUOROQUINOLONAS	
Equilíbrio	$H_2Z^+ \rightleftharpoons HZ + H^+ \rightleftharpoons Z^- + H^+ \quad (HZ^+)$
ácido-base	$Ka_1 \quad Ka_2$
μ_{ef}	$\mu_{ef} = \mu_{H_2Z^+} \chi_{H_2Z^+} + \mu_{HZ} \chi_{HZ} + \mu_{z^-} \chi_{z^-}$ $\mu_{ef} = \mu_{H_2Z^+} \chi_{H_2Z^+} + \mu_{z^-} \chi_{z^-}$
TETRACICLINAS	
Equilíbrio	$H_4Z^+ \rightleftharpoons H_3Z + H^+ \rightleftharpoons H_2Z^- + H^+ \rightleftharpoons HZ^{2-} + H^+ \rightleftharpoons Z^{3-} + H^+$
ácido-base	$Ka_1 \quad Ka_2 \quad Ka_3 \quad Ka_4$
μ_{ef}	$\mu_{ef} = \mu_{H_4Z^+} \chi_{H_4Z^+} + \mu_{H_3Z} \chi_{H_3Z} + \mu_{H_2Z^-} \chi_{H_2Z^-} + \mu_{HZ^{2-}} \chi_{HZ^{2-}} + \mu_{z^{3-}} \chi_{z^{3-}}$ $\mu_{ef} = \mu_{H_4Z^+} \chi_{H_4Z^+} + \mu_{H_2Z^-} \chi_{H_2Z^-} + \mu_{HZ^{2-}} \chi_{HZ^{2-}} + \mu_{z^{3-}} \chi_{z^{3-}}$

A partir do cálculo das frações de dissociação e dos valores das mobilidades eletroforéticas de cada espécie (Tabela III.6) foi possível calcular as mobilidades eletroforéticas efetivas para cada antimicrobiano, em função do pH do eletrólito (Figura III.14 e III.15).

Tabela III.6 Mobilidades eletroforéticas para os antimicrobianos.

Analitos	Mobilidades eletroforéticas $\mu(\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}) \times 10^{-4}$			
	μ_1	μ_2	μ_3	μ_4
TC ^a	1,54	-1,52	-3,36	-6,47
CTC ^a	1,94	-1,91	-3,05	-4,38
OTC	1,64	-1,58	-3,47	-4,23
DXC ^a	1,33	-1,25	-3,59	-5,77
CLF ^b	-2,22	-	-	-
DANO ^c	2,22	-1,59	-	-
CIPRO ^c	2,29	-1,66	-	-
ENRO ^c	2,15	-1,56	-	-
SMZ ^d	-2,05	-	-	-
SQX ^d	-2,03	-	-	-
SMX ^d	-2,28	-	-	-

^aTAVARES & MCGUFFIN, 1994; ^bGOMEZ e cols, 2003; ^cBARRON e cols., 2001;

^dLIN e cols, 1997a.

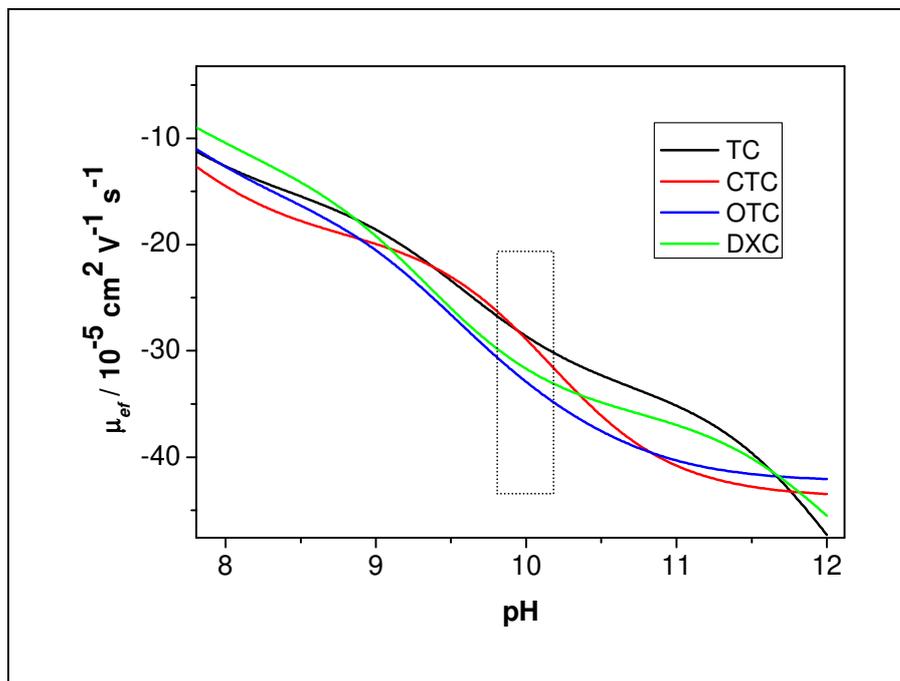


Figura III.14 Mobilidades eletroforéticas efetivas ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) das tetraciclina, obtidas em função do pH do eletrólito.

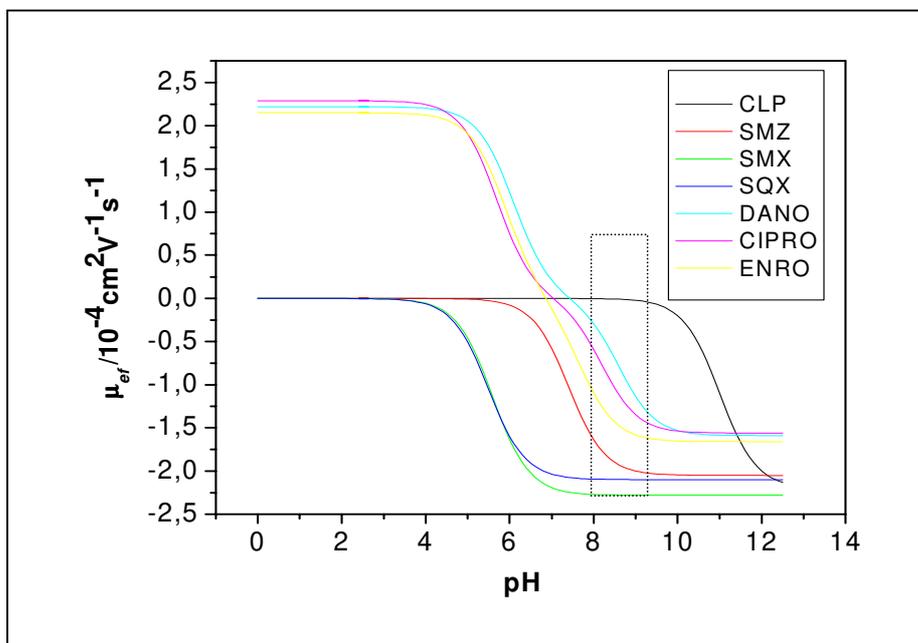


Figura III.15 Mobilidades eletroforéticas efetivas das fluoroquinolonas, cloranfenicol e sulfonamidas, obtidas em função do pH do eletrólito.

Segundo os resultados obtidos para as mobilidades efetivas, apresentados nos gráficos das Figuras III.14 e III.15, foi observado que seria possível a separação das tetraciclinas em pH $10,25 \pm 0,25$; e as sulfonamidas, cloranfenicol e fluoroquinolonas em pH $8,25 \pm 0,75$. A ordem de eluição para as tetraciclinas no pH 10 seria: TC, CTC, DXC e OTC. Para os antimicrobianos do grupo A, a ordem de eluição seria: CLF, DANO, CIPRO, ENRO, SMZ, SQX e SMX. Uma vez estabelecida a faixa ótima de pH para a separação dos antimicrobianos dos grupos A e B, ainda as condições experimentais quanto, concentração do eletrólito, temperatura e voltagem precisavam ser otimizadas para o grupo A e voltagem e temperatura para o grupo B, o que foi realizado mediante emprego de um planejamento experimental.

III.5.1.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA A SEPARAÇÃO DAS TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS, FLUOROQUINOLONAS E CLORANFENICOL ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Nos planejamentos, os antimicrobianos foram agrupados de acordo com a melhor separação dos mesmos nos eletrólitos escolhidos anteriormente, assim temos:

Grupo A: TC, OTC, CTC e DXC.

Grupo B: DANO, CIPRO, ENRO, SQX, SMX, SMZ e CLF.

Grupo A

Para a determinação das variáveis mais importantes, foi realizado para o grupo A um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}_{IV} , tendo como variáveis o pH, temperatura, concentração do eletrólito e voltagem (Tabela III.7).

Tabela III.7 Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}_{IV} para a separação dos antimicrobianos do grupo A por CE. Eletrólito: carbonato de sódio + EDTA 1 mmol L⁻¹.

Variáveis	-	+
A - pH	10,5	12,5
B - Temperatura (°C)	21	25
C - Concentração do carbonato (mmol L ⁻¹)	40	80
D - Voltagem kV	11	15

No planejamento fatorial fracionário para as tetraciclinas foram encontrados três efeitos principais: pH, concentração do eletrólito e temperatura (Tabela III.8). Estas variáveis encontradas foram consideradas para a realização do subsequente planejamento composto central (17 ensaios).

Tabela III.8 Planejamento experimental 2^3 composto central, para a separação dos antimicrobianos do grupo A por CE. Eletrólito: carbonato de sódio + EDTA 1 mmol L⁻¹. Voltagem 13 kV.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
A - pH	9,3	10	11	12	12,7
B - Concentração do carbonato (mmol L ⁻¹)	43	50	60	70	77
C - Temperatura (°C)	20	21	23	25	26

No planejamento composto central para o grupo A, se considerou como resultado o número de picos separados (4 analitos). O tempo de separação para os antimicrobianos foi de 8 min.

Através do programa Statistic, Statsoft Inc., v. 5.5 (EUA), foram obtidas as Figuras III.16 e III.17, que apresentam as superfícies de respostas ajustadas ao número de picos separados versus as variáveis (Figura 18, concentração do eletrólito versus pH e Figura 19 temperatura versus concentração do eletrólito).

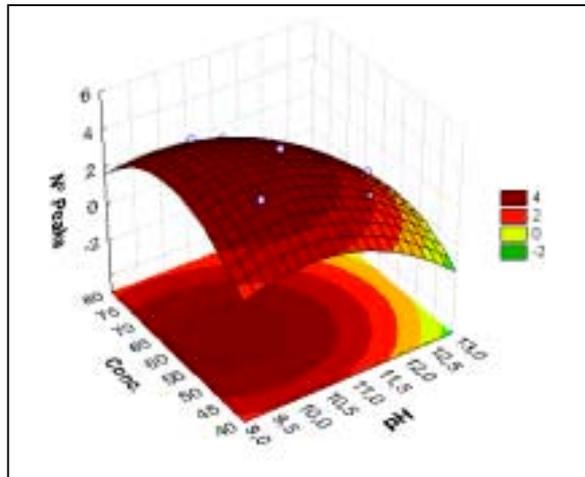


Figura III.16 Superfície de resposta da concentração do eletrólito carbonato + EDTA 1 mmol L^{-1} versus pH, obtida do planejamento fatorial 2^3 para a separação dos picos dos antimicrobianos grupo A. Considerando as variáveis concentração do eletrólito, temperatura e pH.

Da Figura III.18, se pode abstrair que o pH 10 e a concentração de eletrólito em torno de 60 mmol L^{-1} permite a separação do maior número de antimicrobianos do grupo A.

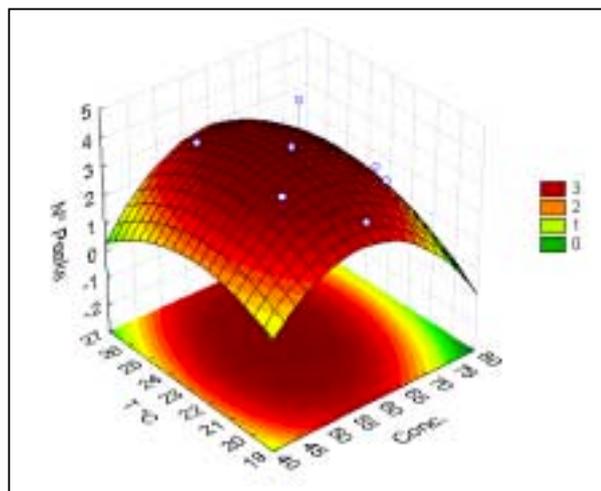


Figura III.17 Superfície de resposta da temperatura versus concentração do eletrólito carbonato + EDTA 1 mmol L^{-1} , obtida do planejamento fatorial 2^3 para a separação

dos picos dos antimicrobianos grupo A. Considerando as variáveis concentração do eletrólito, temperatura e pH.

Grupo B

Para o grupo B de antimicrobianos foi realizado um planejamento 2^2 , tendo como variáveis a temperatura e a voltagem (Tabela III.9). Cabe mencionar que em um primeiro momento também se fez um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}_{IV} para o grupo B com as variáveis: pH, concentração do eletrólito, temperatura e voltagem, seguido de um planejamento 2^3 , considerando as variáveis: pH (6,8 – 10,2), concentração do eletrólito (113 – 129 mmol⁻¹) e voltagem (9,5 – 16,5 kV). Tendo em vista que a concentração do eletrólito poderia gerar uma corrente alta como consequência do efeito Joule, se fez um novo estudo univariado deste parâmetro, para em seguida se realizar um novo planejamento 2^2 para o grupo B.

Tabela III.9 Planejamento experimental 2^2 composto central para a separação dos antimicrobianos do grupo B por CE. Eletrólito: fosfato/tetraborato 20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹. pH 8,5.

Variáveis	-	0	+	-1,41	1,41
A Temperatura (°C)	20	23	26	19	27
B Voltagem (kV)	17	20	23	16	24

Novamente se considerou no planejamento composto central para o grupo B como resultado o número de picos separados (7 analitos). O tempo necessário para a separação dos antimicrobianos do grupo B foi de 12 minutos.

Através do programa Statistic, Statsoft Inc., v. 5.5 (EUA) foi obtida a Figura III.18, que mostra a superfície de resposta ajustada ao número de picos separados versus as variáveis (voltagem versus a temperatura).

A Figura III.19 revela como condição ótima o extremo inferior e o superior de temperatura e voltagem. Cabe ressaltar que para as escolhas das variáveis foi evado em consideração também o efeito Joule, que poderia ser originado ao se gerar correntes muito altas. Estes valores foram obtidos realizando as medidas de

corrente em diferentes voltagens. Através de uma reta traçada sobre os pontos do gráfico da voltagem versus corrente, pode-se estimar a voltagem a ser usada. Um desvio positivo das linearidades mostra que a capacidade da remoção da temperatura do sistema esteve excedida. (ver Figura III.19 e 20).

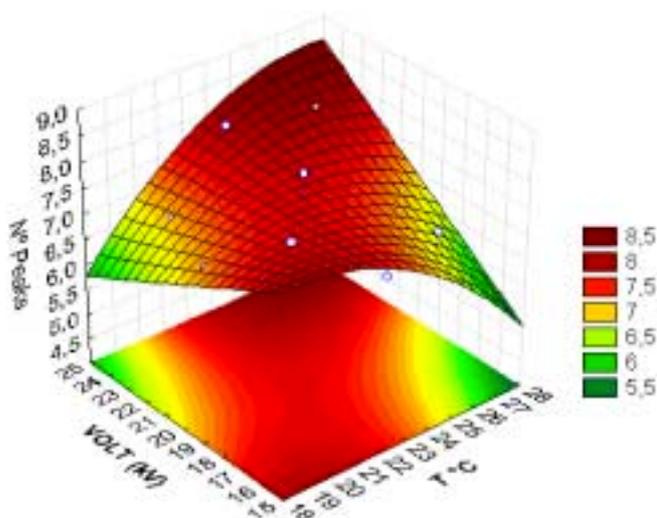


Figura III.18. Superfície de resposta da voltagem (kV) versus temperatura (°C) obtida do planejamento fatorial 2^2 para a separação dos picos dos antimicrobianos do grupo B.

No caso dos antimicrobianos do grupo A, sendo utilizado o eletrólito carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} , foi selecionada a voltagem de 13 kV, uma vez que este valor está dentro da faixa linear aceitável. No caso do eletrólito fosfato/tetraborato, foi escolhida uma voltagem de 24 kV (ver Figura III.20). Embora este valor esteja quase perto do desvio da linearidade, este valor foi escolhido por resultar em tempos de análise menores (15 min) do que uma voltagem de 17 kV, na qual a corrida levaria 26 min.

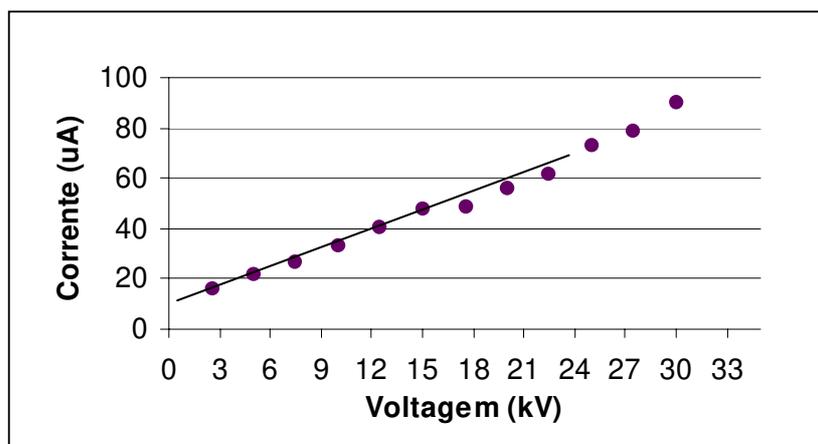


Figura III.19 Gráfico do efeito Joule para o eletrólito carbonato de sódio 60 mmol L^{-1} , pH 10, para a determinação das tetraciclinas.

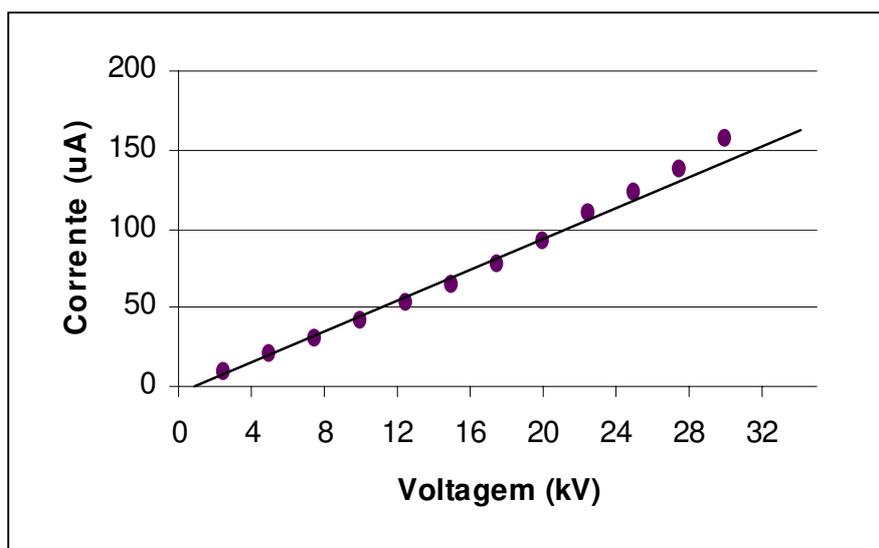


Figura III.20 Gráfico do efeito Joule para o eletrólito Fosfato de sódio 60 mmol L^{-1} / tetraborato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para a determinação dos antimicrobianos do grupo B.

Em resumo, foram estabelecidas as seguintes condições ótimas de trabalho:

Grupo A - eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, voltagem 13 kV e λ 270 nm.

Grupo B - eletrólito Fosfato de sódio 60 mmol L⁻¹ / tetraborato 20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, temperatura 26 °C, voltagem 24 kV e λ 203 (sulfonamidas) e 270 nm (fluoroquinolonas e cloranfenicol).

Eletroferogramas característicos nas condições otimizadas estão apresentados nas Figuras III.21 e III.22.

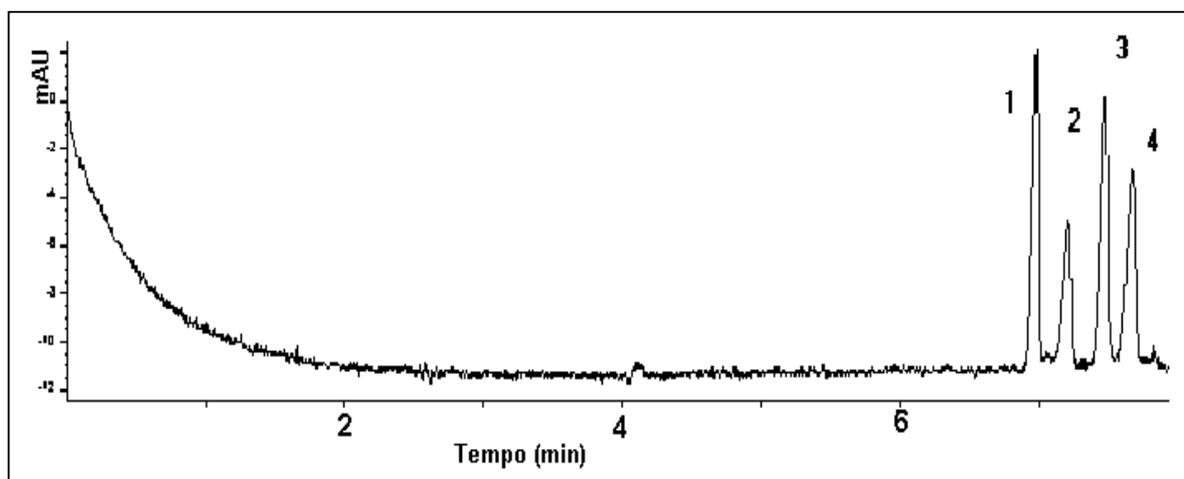


Figura III.21 Eletroferogramas de uma mistura de: 1.TC (t_m 6.9 min), 2.CTC (t_m 7,2 min), 3.OTC (t_m 7,5 min) e 4.DXC (t_m 7,7 min). Concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, 13 kV de voltagem e λ 270 nm.

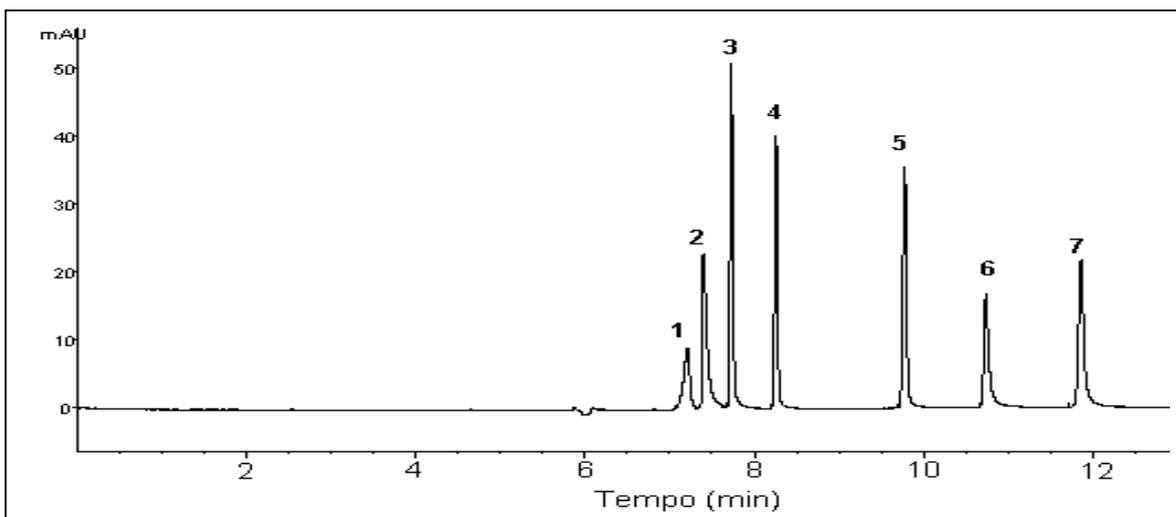


Figura III.22 Eletroferogramas de uma mistura de: 1.CLF, 2.DANO, 3.CIPRO, 4.ENRO, 5.SMZ, 6.SQX e 7.SMX. (t_{m1} 7,2 min, t_{m2} 7,4 min, t_{m3} 7,7 min, t_{m4} 8,3 min, t_{m5} 9,8 min, t_{m6} 10,7 min, t_{m7} 11,86 min, respectivamente). Concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eletrólito Fosfato de sódio 60 mmol L^{-1} / tetraborato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura $26 \text{ }^\circ\text{C}$, voltagem 24 kV e λ 203 (sulfonamidas) e 270 nm (fluoroquinolonas e cloranfenicol).

A partir dos eletroferogramas obtidos foram comparados os tempos de migração obtidos para cada analito com os estimados através dos cálculos das mobilidades eletroforéticas (vide Figuras III.21 e III.22). Os tempos de migração dos antimicrobianos estimados através dos cálculos conferem com os tempos de migração obtidos experimentalmente, excetuando para a OTC no grupo A. A OTC deveria eluir antes da DXC, no entanto, as mobilidades eletroforéticas são muito próximas e os tempos de migração também, DXC (7,5 min) e OTC (7,7 min).

A vantagem do método estabelecido é a determinação de vários antimicrobianos com um mesmo método, nas mesmas condições de trabalho. Isto representa um benefício na determinação de antimicrobianos em fórmulas farmacêuticas, pela facilidade e ganho de tempo e material de consumo comparado com os métodos apresentados na farmacopéia, nos quais são indicadas metodologias diferentes para cada analito, mesmo sendo estes da mesma família.

Cabe mencionar, que depois de diversos estudos realizados foi verificado que o método desenvolvido usando a CE-DAD não seria vantajoso frente a HPLC-DAD para a determinação dos antimicrobianos em leite nas concentrações requeridas, ou seja, abaixo do LMR de 100 ng mL⁻¹. O sistema de detecção do equipamento de eletroforese não apresentava detectabilidade adequada, requerendo um preparo de amostra exaustivo. Em decorrência destes fatos foram realizados o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas visando apenas o controle de qualidade de fármacos, contendo os antimicrobianos CLF, DANO, CIPRO, ENRO, SMX, SQX, SMZ, OTC, TC e CTC.

III.5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS, FLUOROQUINOLONAS, SULFONAMIDAS E CLORANFENICOL EM FÁRMACOS

Os parâmetros a serem avaliados para a validação do método dependem do objetivo a que se propõe. Neste sentido, considerando que o método desenvolvido tem como finalidade testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos, classificado como categoria I, segundo a ANVISA (2003), foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade) e robustez do método. Em adição, foi estimada a detectabilidade do método. O protocolo empregado para o estabelecimento dos parâmetros de validação está descrito na parte experimental (Item III.4.4).

CONFORMIDADE DO SISTEMA

Antes de proceder a avaliação do método proposto por eletroforese capilar para as determinações de TC, CTC, OTC, DXC, CLF, DANO, CIPRO, ENRO, SMZ, SQX e SMX em formulações farmacêuticas, foi avaliada a conformidade do sistema e a estabilidade das soluções. As estabilidades das soluções para todos os antimicrobianos foram avaliadas no desenvolvimento do método do HPLC (Capítulo IV) e os resultados estão descritos no item IV.3.7.3.2. Na avaliação da conformidade do sistema, os seguintes parâmetros foram considerados: número de pratos (N) e

resolução (Rs). Os mesmos procedimentos foram realizados para o sistema cromatográfico empregando os métodos recomendados na Farmacopéia, tendo em vista que esta técnica foi utilizada para avaliar a exatidão do método de eletroforese para a quantificação dos analitos mencionados anteriormente. Os resultados são apresentados nas Tabela III.10 e III.11.

Ambos os métodos, tanto de CE como HPLC, apresentaram resoluções adequadas para todos os analitos ($R_s > 2$). Os pratos obtidos na eletroforese capilar mostraram ser muito maior do que aqueles obtidos na HPLC ($N > 2000$).

Tabela III.10 Parâmetros de conformidade de sistema dos métodos de CE e HPLC, para o grupo A.

	CE				HPLC
	TC	CTC	OTC	DXC	TC
Antimicrobianos					
Pratos (N)/m	227826	132570	225671	114242	26448
Resolução (Rs)	4,1	4,8	3,0	-	-
Assimetria do pico (A_s)	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0
Tempo de migração (CE) ou tempo de retenção (HPLC) /min	6,99	7,21	7,49	7,68	8,05

(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes. Valores de referência: $R_s > 2,0$; $A_s < 2$; $N > 2000$ (SHABIR, 2003).

SELETIVIDADE

O primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade, uma vez que o método deve ser capaz de identificar o analito inequivocamente na presença de outros concomitantes. A seletividade é um parâmetro que deve ser demonstrado e depende do método analítico empregado. Para os métodos de separação, a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de migração característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra.

Os resultados da seletividade foram avaliados em relação à concentração inicial e à recuperada após exposição dos analitos a diferentes condições de estresse por um período de 60 min: temperatura (55 °C), NaOH 0,1 mol L⁻¹, ácido HCl 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3 % (Figura III.23).

Tabela III.11 Parâmetros de conformidade de sistema dos métodos de CE e HPLC, para o grupo B.

	CE							HPLC			
Antimicrobianos	CLF	DANO	CIPRO	ENRO	SMZ	SQX	SMX	CLF	CIPRO	ENRO	SMX
Pratos (N)/m (mil)	71654	142394	435889	485452	412870	318274	312552	40560	21320	28184	18752
Resolução (Rs)	-	2,66	3,97	5,39	23,0	9,53	10,15	-	-	2,0	-
Tempo de migração (CE) ou tempo de retenção (HPLC) /min	7,2	7,4	7,7	8,3	9,8	10,7	11,9	2,46	4,11	6,32	1,57

(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes. Valores de referência: Rs >2,0; N>2000 (SHABIR, 2003).

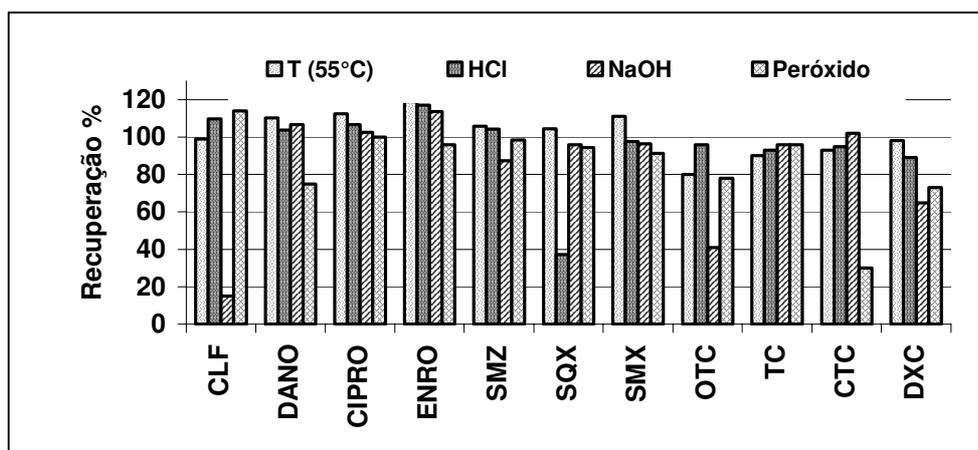


Figura III.23 Estudo da degradação de CLF, DANO, CIPRO, ENRO, SMZ, SMX, SQX, TC, CTC, OTC e DXC, expressos em recuperação (%).

A partir da Figura III.23, observa-se que enquanto o CLF e OTC são instáveis no meio básico, a SQX é instável no meio ácido. No meio de peróxido hidrogênio a CTC se mostrou instável, sendo que um pico apareceu no eletroferograma (tempo de migração de 4,2 min), como é mostrado na Figura III.24, possivelmente seria um efeito do EOF. Em geral, os produtos de degradação formados não afetaram a seletividade do método. Os eletroferogramas de todos os testes em condições de estresse são apresentados no capítulo de ANEXOS.

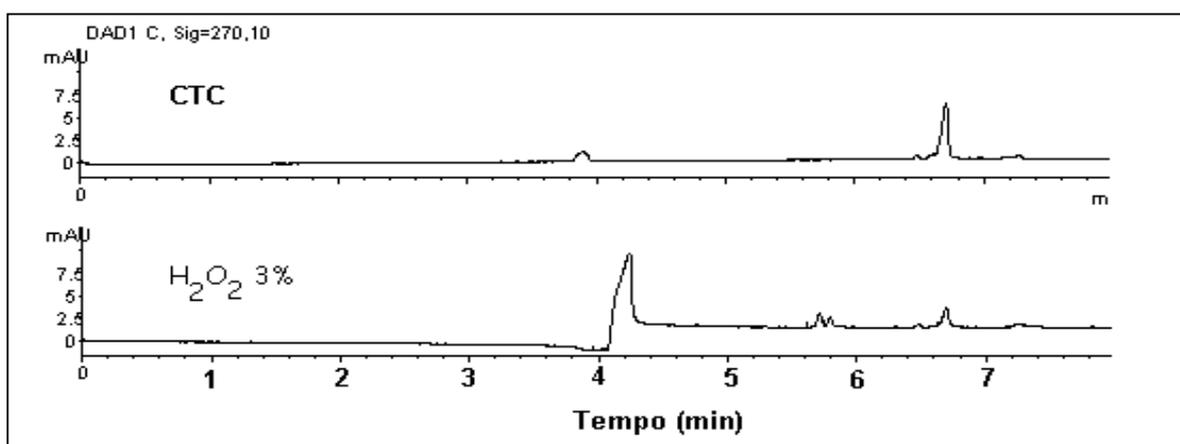


Figura III.24 Condições de estresse para o CTC com H₂O₂ 3 %.

CURVA ANALÍTICA

A curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. A linearidade determina até que ponto esta relação se mantém linear.

As curvas analíticas foram construídas em duplicata em cinco níveis de concentração 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para CTC, OTC e DXC e 10,0; 50,0; 100; 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para TC e 50,0; 100; 150; 200; 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CLF, CIPRO, ENRO, SMZ e SMX (Ver Figura 25 e 26), conforme descrito em III.4.4. Para o caso da CIPRO e ENRO, foi utilizado a DANO com padrão interno e para SMZ e SMX foi utilizado SQX como padrão interno.

Mediante a curva analítica foram calculados os valores das concentrações do analito nas amostras, com base nos valores das áreas dos picos nos tempos de migração característicos obtidos nos eletroferogramas.

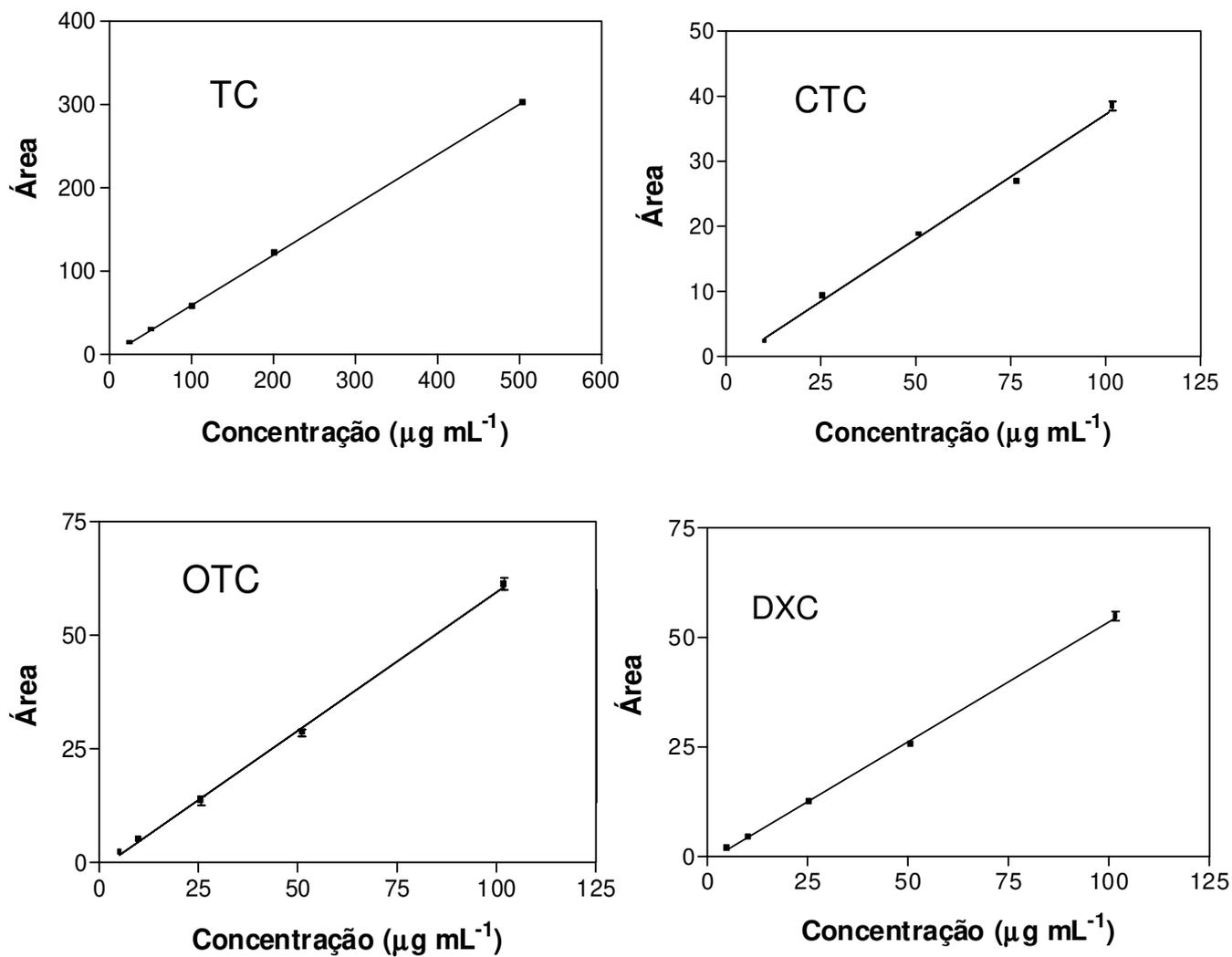


Figura III.25 Curvas analíticas dos antimicrobianos do grupo A: TC, CTC, OTC e DXC.

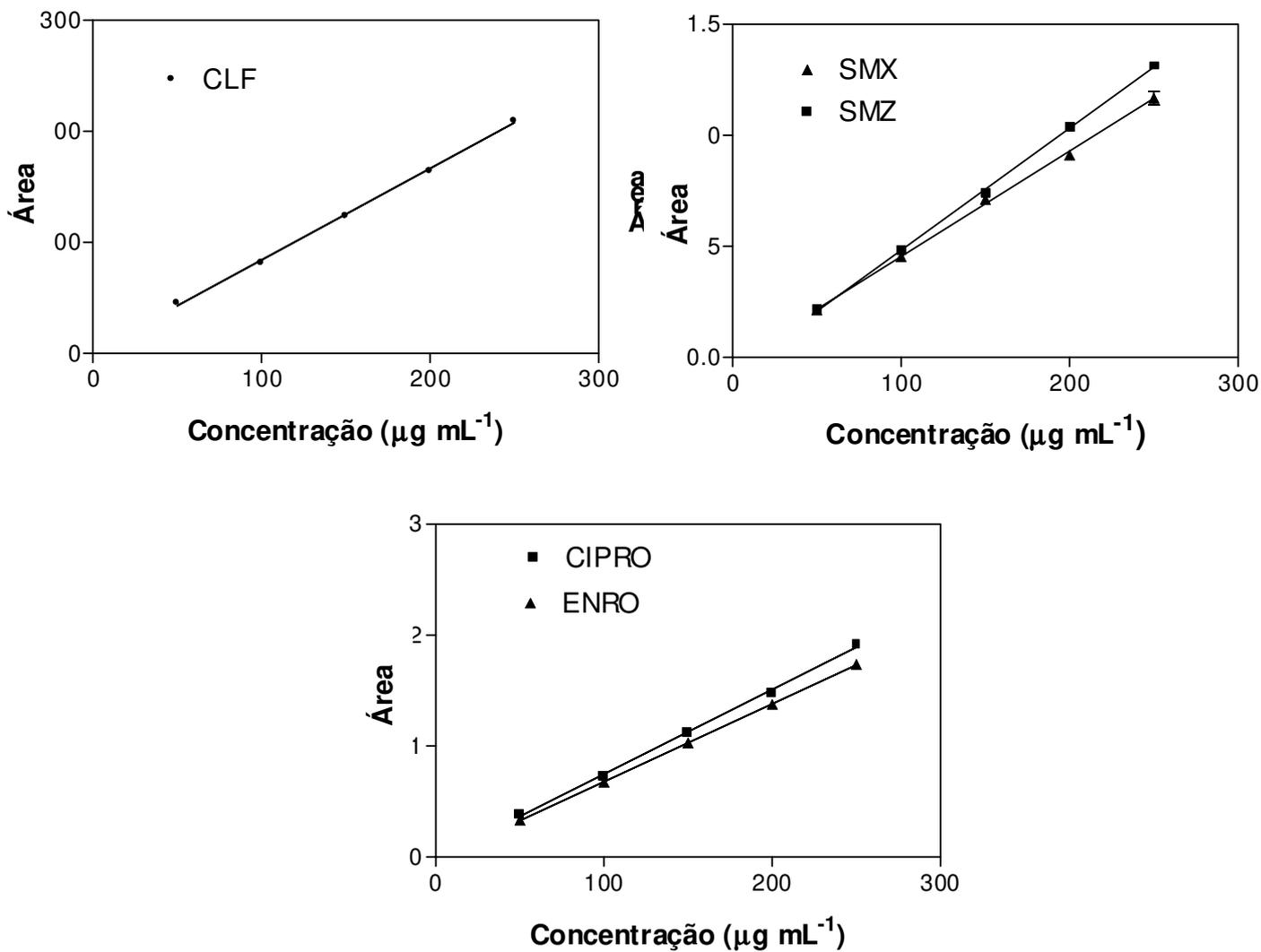


Figura III.26 Curvas analíticas dos antimicrobianos do grupo B: CLF, SMZ, SMX (SQX, como padrão interno), CIPRO, e ENRO (DANO, como padrão interno).

A partir das curvas analíticas e da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foram obtidas as seguintes equações e os respectivos coeficientes de correlação (r):

TC	$Y = 0,603X - 1,26$	$r = 0,999$
CTC	$Y = 0,383X - 1,08$	$r = 0,998$
OTC	$Y = 0,610X - 1,48$	$r = 0,996$
DXC	$Y = 0,548X - 1,18$	$r = 0,998$

CLF	$Y = 0,8254X + 1,57$	$r = 0,999$
CIPRO	$Y = 0,0076X - 0,12$	$r = 0,998$
ENRO	$Y = 0,0070X - 0,02$	$r = 0,999$
SMZ	$Y = 0,0055X - 0,07$	$r = 0,999$
SMX	$Y = 0,0047X - 0,02$	$r = 0,997$

Onde, Y é a resposta em unidades de área e X é a concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

FAIXA LINEAR, LINEARIDADE, SENSIBILIDADE

Para qualquer método quantitativo existe uma faixa de concentração do analito na qual o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados e pode ser aplicado à análise de amostras. Para fármacos a faixa linear deve abranger de 80 % a 120 % da concentração teórica da amostra teste.

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detetor varia em função da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica e os resultados estão sumarizados nas Tabela III.12 e III.13.

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear. A ANVISA preconiza que o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99.

Cabe destacar que para avaliar a linearidade do método analítico, os cálculos da regressão linear não são suficientes e se faz adequado avaliar também os valores dos resíduos (ver Figura III.27 e III.28). Se os valores dos resíduos estiverem aleatoriamente distribuídos ao longo da linha da regressão, então a linearidade está confirmada.

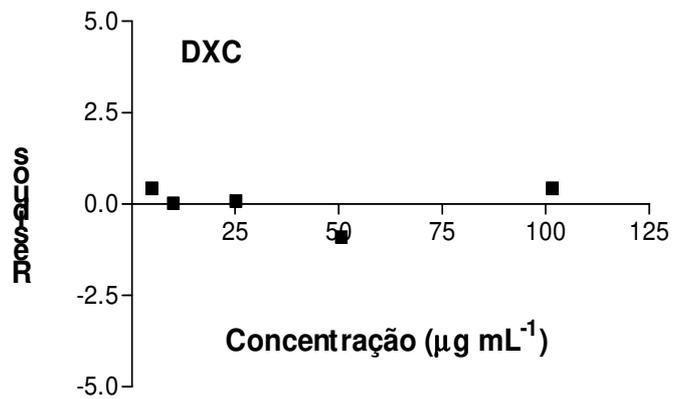
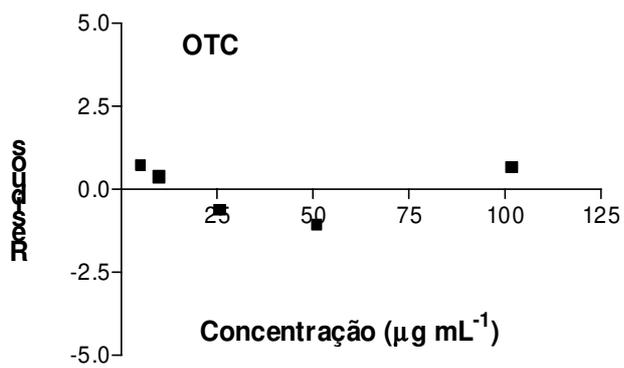
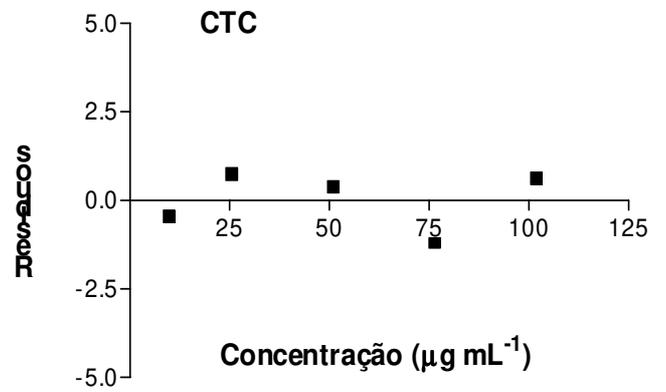
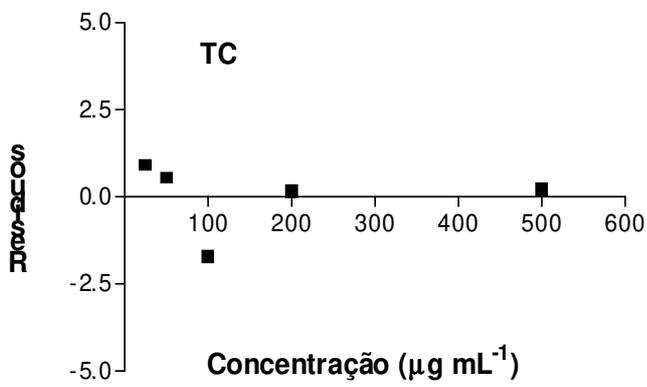


Figura III.27 Gráficos de resíduos para TC, CTC, OTC e DXC.

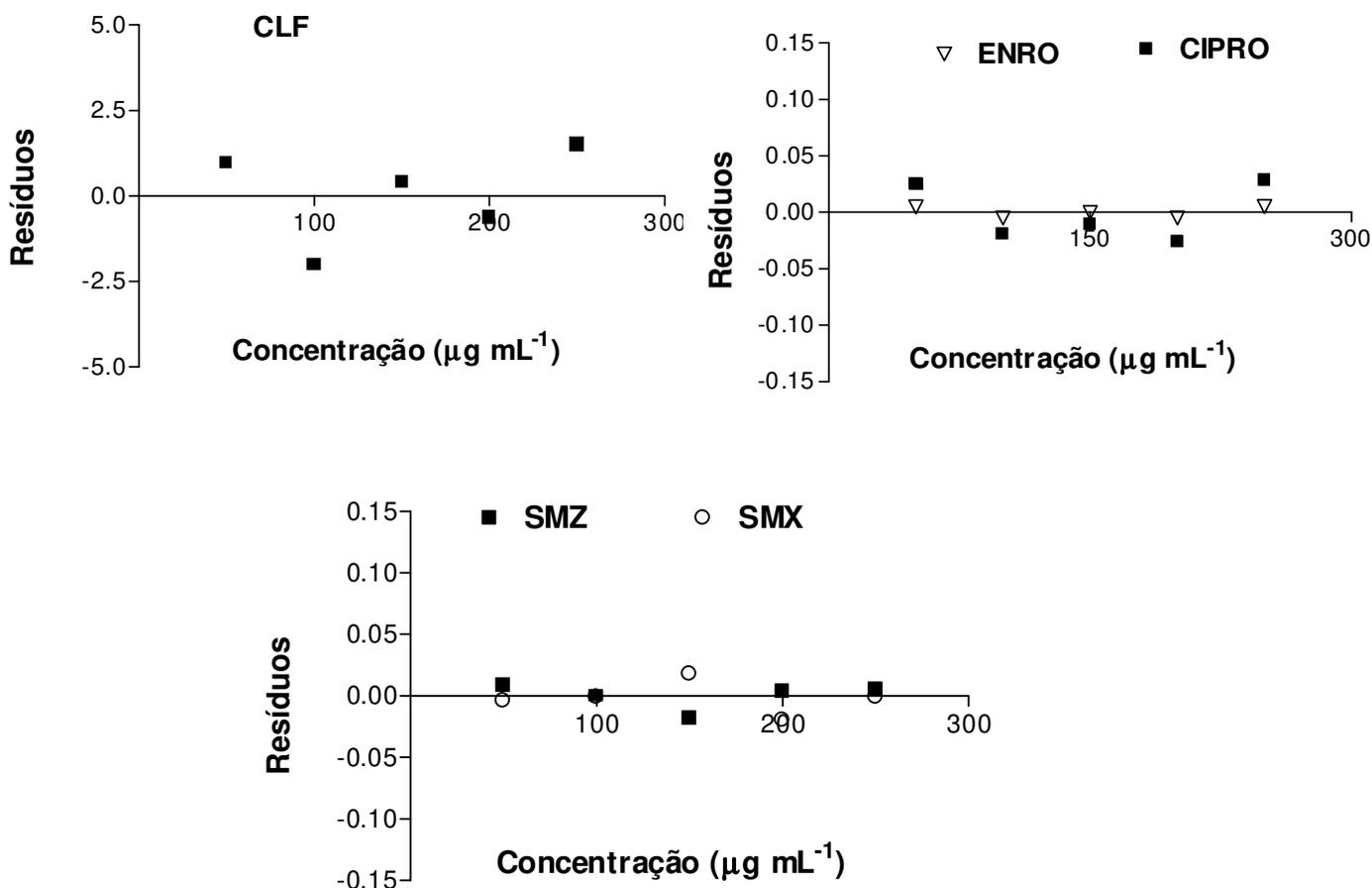


Figura III.28 Gráficos de resíduos para CIPRO, ENRO, CLF, SMX e SMZ.

Segundo as figuras III.27 e III.28 apresentadas, observa-se que para os analitos avaliados utilizando padrão interno (ENRO, CIPRO, SMX e SMZ), os resíduos foram menores comparados com aqueles que foram avaliados usando padronização externa.

Os parâmetros linearidade, faixa linear e sensibilidade foram estabelecidos a partir das curvas analíticas (Figura III.25 e III.26) obtidas para cada antimicrobiano. Os valores estão apresentados nas Tabelas III.12 e III.13 e estão de acordo com as recomendações da ANVISA.

PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante cinco determinações em um mesmo dia, no mesmo equipamento, pelo mesmo analista, e em um nível de concentração. Os resultados foram expressos como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) e estão apresentados na Tabela III.12 e III.13. Também foi avaliada a precisão intermediária (inter-ensaio) para verificar a concordância entre os resultados obtidos no mesmo laboratório em dias diferentes, porém no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. Para tanto, foram realizadas análises em dois níveis de concentração em 4 dias diferentes. O resultados também foram expressos pelo RSD e estão apresentados nas Tabelas III.12 e III.13.

A precisão intra-ensaio obtida foi de 0,7 – 2,0 % e inter-ensaio foi de 1,7 a 2,6 %. A precisão obtida está abaixo de 5 %, valor máximo aceitável pela ANVISA.

Tabela III.12 Parâmetros de validação para TC e CTC, OTC e DXC.

Parâmetros	TC	CTC	OTC	DXC
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10 - 250	10 - 100	10 - 100	10 - 100
Sensibilidade (ua $\mu\text{g mL}^{-1}$) ($P < 0,05$)	$0,57 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$
Linearidade (r)	0,999	0,998	0,996	0,998
Precisão Intra-ensaio (RSD %)				
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=5	1,5	0,7	1,3	2,0
Precisão Inter-ensaio (RSD %)				
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=4	2,5	2,3	2,4	2,6
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=4	2,3	1,7	2,3	2,6
Detectabilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,0	3,0	3,0	3,0

RSD: estimativa do desvio padrão relativo. ua: unidades de área.

Tabela III.13 Parâmetros de validação para CLF, CIPRO, ENRO, SMZ e SMX. DANO padrão interno para CIPRO e ENRO e SQX padrão interno para SMZ e SMX.

Parâmetros	CLF	CIPRO	ENRO	SMZ	SMX
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50 - 250	50 - 250	50 - 250	50-250	50-250
Sensibilidade (ua $\mu\text{g mL}^{-1}$) P<0,05)	0,83 \pm 0,01	0,0070 \pm 0,0001	0,0070 \pm 0,0001	0,0050 \pm 0,0001	0,0050 \pm 0,0001
Linearidade (r)	0,999	0,999	0,999	0,999	0,997
Precisão Intra- ensaio (RSD %) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=5	1,5	2,1	1,4	1,2	1,4
Precisão Inter- ensaio (RSD %), 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=5	1,3	2,3	2,1	1,0	1,7
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=5	1,6	1,0	1,5	2,5	2,0
Detectabilidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0

RSD: estimativa do desvio padrão relativo. ua: unidades de área.

EXATIDÃO

A exatidão do método foi avaliada para TC, CLF, CIPRO, ENRO e SMX, mediante a comparação do método proposto com os métodos de referência da Farmacopéia Americana (USP XXVIII, 2005), descritos na parte experimental, item III.4.5, uma vez que não se dispunha de material de referência certificado. Os antimicrobianos foram selecionados de acordo com a sua disponibilidade no comércio e facilidade de aquisição. Diferentes formulações foram analisadas, entre essas, cápsulas, comprimidos, soluções injetáveis e soluções oftálmicas. Os antimicrobianos CIPRO, ENRO e SMZ foram quantificados usando o método de padronização interna. Para tanto, a DANO foi usada como padrão interno para as fluoroquinolonas e SQX para a sulfonamida (SMX). Os resultados obtidos são

apresentados nas Tabelas III.14 a III.17. O valor médio obtido pelo método proposto (CE) e o de referência (HPLC) não tiveram uma diferença significativa ($P < 0,05$), confirmando a exatidão dos métodos eletroforéticos desenvolvidos.

Tabela III.14 Resultados das análises de amostras comerciais a base de tetraciclina (TC) (cápsulas 500 mg) por CE e HPLC.

	Amostra 1		Amostra 2	
	CE	HPLC	CE	HPLC
Teor médio* (mg/cápsula)	545	510	502	491
s (mg/cápsula)	10	10	26	18
RSD (%)	1,9	1,9	4,1	3,7

(*) $n=5$; s: estimativa do desvio padrão; RSD, estimativa do desvio padrão relativo. A Farmacopéia USP XXVIII estabelece que o teor do princípio ativo para TC deve estar entre 90 % (450 mg) e 125 % (625 mg).

Tabela III.15 Resultados das análises de amostras comerciais a base de cloranfenicol (CLF)(solução oftálmica 4 mg mL⁻¹) por CE e HPLC.

	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC
Teor médio* (mg mL ⁻¹)	4,48	3,60	4,43	3,59	4,23	3,64
s (mg mL ⁻¹)	0,05	0,02	0,06	0,03	0,07	0,08
RSD (%)	1,1	0,6	1,6	0,9	2,4	2,2

(*) $n=5$; s: estimativa do desvio padrão; RSD, estimativa do desvio padrão relativo. A USP XXVIII declara como faixa aceitável para CLF em solução oftálmica 90 % (3,6 mg mL⁻¹) a 130 % (5,2 mg mL⁻¹).

Tabela III.16 Resultados das análises de amostras comerciais a base de CIPRO (comprimidos 500 mg) e ENRO (solução injetável 50 mg mL⁻¹) por CE e HPLC.

	Amostra CIPRO		Amostra ENRO 1		Amostra ENRO 2		Amostra ENRO 3	
	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC
Teor médio [*] (mg/comprimido) ^c ou (mg mL ⁻¹) ^e	501	450,0	47	52	48	52,0	49,0	52,0
s (mg/comprimidos) ^c ou (mg mL ⁻¹) ^e	1	0,2	1	1	1	0,2	0,4	0,4
RSD (%)	2,5	0,04	1,8	1,2	1,8	0,4	0,8	0,8

(*) n=5; s: estimativa de desvio padrão (mg mL⁻¹); RSD, estimativa do desvio padrão relativo, ^c unidades para CIPRO, ^e unidades para ENRO. A USP XXVIII declara como faixa aceitável para CIPRO em comprimidos 90 % (450 mg/comprimido) a 110% (550 mg/comprimido) e para soluções injetáveis de 90 % (45 mg mL⁻¹) a 110 % (55 mg mL⁻¹).

Tabela III.17 Resultados das análises de amostras comerciais a base de SMX (comprimidos 400 mg e suspensão oral 40 mg mL⁻¹) por CE e HPLC.

	Amostra 1 ^t		Amostra 2 ^t		Amostra 3 ^s	
	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC
Teor médio [*] (mg/comprimidos) ou (mg mL ⁻¹) ^s	411	409	435	382	39	36
s (mg/comprimidos) ou (mg mL ⁻¹) ^s	7	5	8	7	1	1
RSD (%)	1,7	1,1	1,7	1,8	1,7	1,8

(*) n=5; s: estimativa de desvio padrão (mg/mL); RSD, desvio relativo padrão, ^s unidades para a suspensão oral, ^t comprimidos. A USP XXVIII preconiza que as faixas aceitáveis são 93 % (372 mg) a 107 % (428 mg) para comprimidos e 90 % (36 mg mL⁻¹) a 110 % (44 mg mL⁻¹) para suspensão oral.

Para todas as formulações avaliadas os valores encontrados estão de acordo com os teores estabelecidos pela USP XXVIII, 2005 ($P < 0,05$). Os resultados obtidos demonstram que a CE é adequada para realizar a determinação dos antimicrobianos estudados nas diversas formulações farmacêuticas, com algumas vantagens frente a HPLC como tempo de análise, custo e simplicidade. O mesmo método desenvolvido por CE pode ser utilizado no controle de qualidade de antimicrobianos de diferentes famílias.

DETECTABILIDADE

A detectabilidade do equipamento foi estimada mediante avaliação de soluções padrão em concentrações decrescentes dos antimicrobianos, até obtenção da relação sinal/ruído igual a 3. Esse procedimento foi realizado principalmente para avaliar o fator de concentração que seria necessário para determinar os antimicrobianos no leite em níveis de concentração abaixo dos LMR estabelecidos. A detectabilidade foi estimada, para todos os antimicrobianos em $3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os limites de detecção e quantificação do método não foram estabelecidos, uma vez que os componentes ativos se encontram em alta concentração na formulação farmacêutica. Segundo a ANVISA, estes parâmetros não são requeridos na validação no controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

ROBUSTEZ

Finalmente, a robustez do método proposto foi avaliada mediante a introdução de pequenas mudanças nos parâmetros experimentais: temperatura, pH e concentração do eletrólito. Para avaliar o efeito destas alterações sobre as respostas para os antimicrobianos dos grupos A e B, foram realizados planejamentos experimentais e plotados os gráficos de contorno de superfície. Os procedimentos empregados para a realização dos ensaios que compõe o planejamento experimental estão descritos no item III.4.4 e os gráficos obtidos nas Figuras III.29 a III.31.

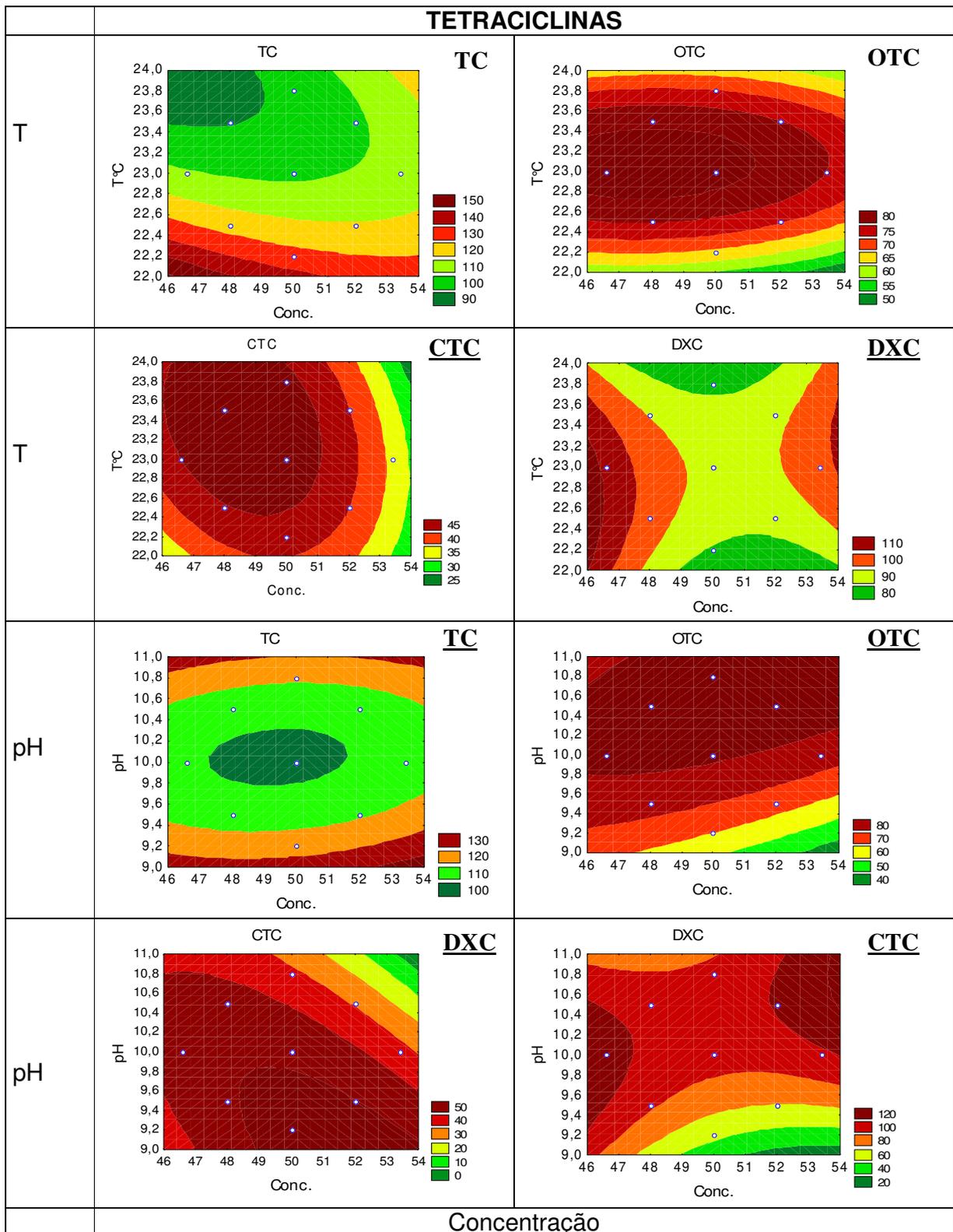


Figura III.29 Respostas de superfície de contorno para TC, CTC, OTC e DXC, usada para avaliar o estudo de robustez no planejamento experimental 2^3 .

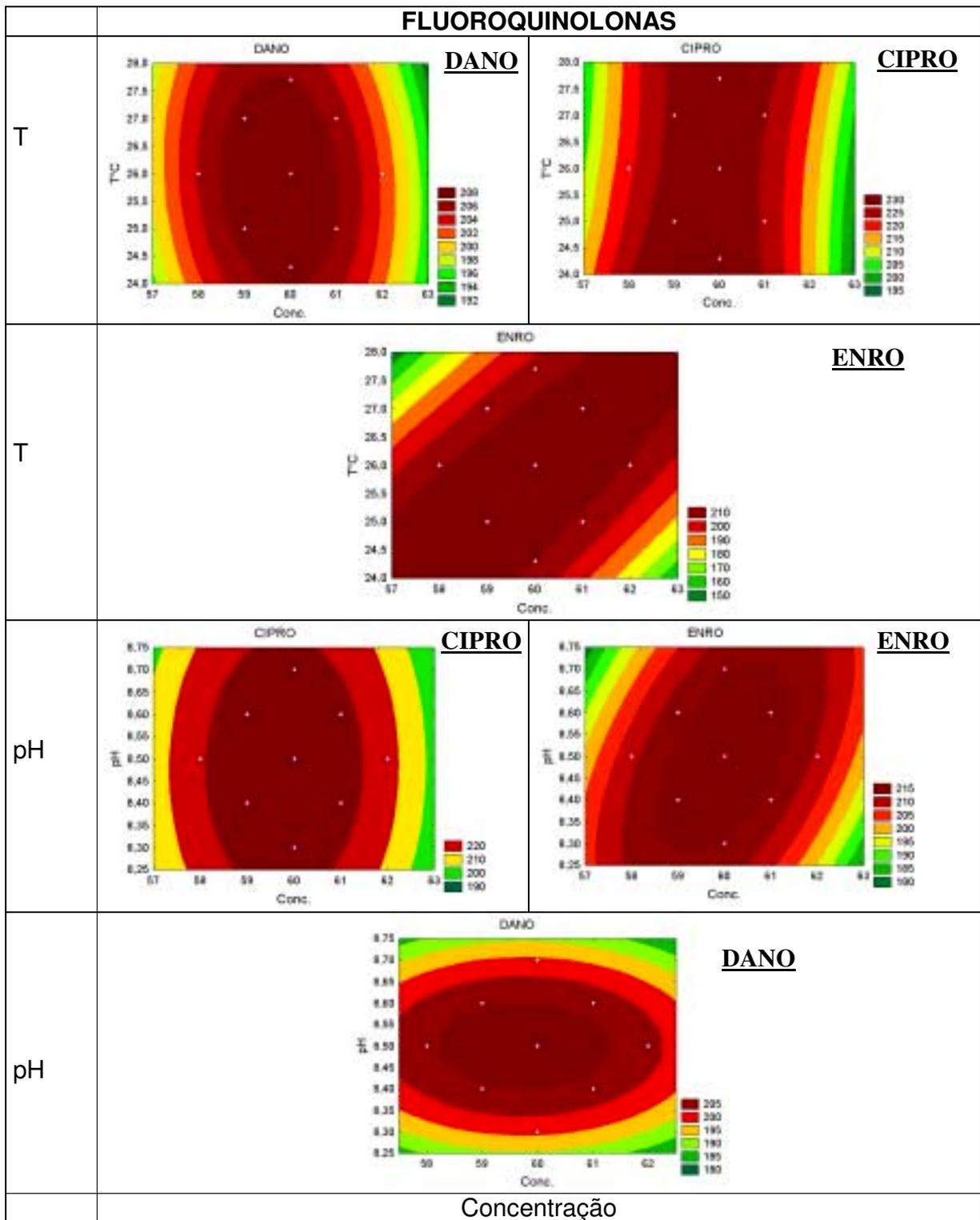


Figura III.30 Respostas de superfície de contorno para DANO, CIPRO e ENRO, usada para avaliar o estudo de robustez no planejamento experimental 2^3 .

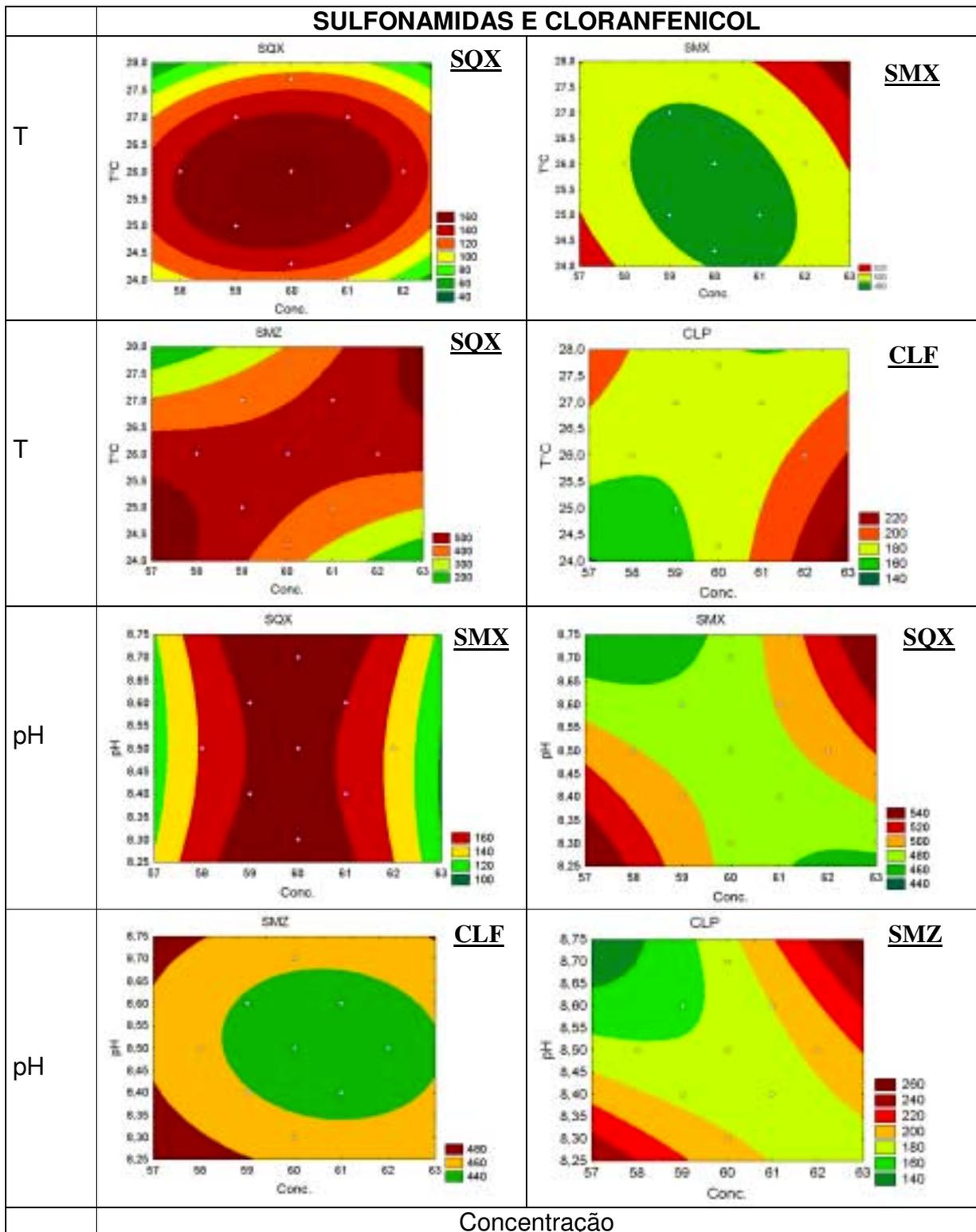


Figura III.31 Respostas de superfície de contorno para SQX, SMX, SMZ e CLF, usada para avaliar o estudo de robustez no planejamento experimental 2^3 .

A robustez foi avaliada mediante análise dos gráficos de contorno, considerando o nível de resposta de maior sinal (delimitado pelo contorno de uma mesma cor) para os antimicrobianos dos grupos A e B. Uma vez que o método deveria ser abrangente, ou seja, a mesma condição para a determinação de todos os antimicrobianos do grupo A, assim como do grupo B, foi necessário estabelecer uma condição única que garantisse a robustez do método naquelas condições. Vale ressaltar que esse compromisso levou a resultados nos quais nem sempre foi alcançada a resposta mais intensa para cada composto isolado.

O estudo permitiu estabelecer as variações dos seguintes parâmetros para o grupo A de antimicrobianos estudados:

- Concentração do eletrólito: $50 \pm 1 \text{ mmol L}^{-1}$ carbonato de sódio,
- pH: $10,0 \pm 0,1$
- Temperatura: $23,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

No caso do grupo B, vemos que o CLF, DANO, CIPRO e ENRO foram menos afetados por variações de temperatura, enquanto a SMZ e SQX foram menos afetadas por variações na concentração do eletrólito. Os resultados obtidos mediante este estudo permitiram estabelecer os seguintes parâmetros para o grupo B:

- Concentração do eletrólito: $60,0 \pm 1 \text{ mmol L}^{-1}$ fosfato de sódio
- pH: $8,5 \pm 0,1$
- Temperatura: $26,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Finalmente, cabe mencionar, que em uma segunda etapa foi avaliada a possibilidade do emprego da técnica de CE para a determinação de resíduos de antimicrobianos em leite. No entanto, a detectabilidade estimada inicialmente ficou em torno de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que requereria uma concentração de 10 a 50 vezes para que fosse possível quantificar os resíduos no leite no limite máximo de resíduo. Ainda, foi observado efeito matriz, quando foi realizada a concentração no preparo de amostra. Em decorrência destes resultados iniciais, optou-se pelo desenvolvimento do método cromatográfico para a determinação de resíduos de antimicrobianos em leite.

III.6 CONCLUSÃO

A eletroforese capilar mostrou ser adequada para a determinação de antimicrobianos de diferentes famílias em uma mesma corrida, usando o mesmo procedimento de análise.

Embora existam inúmeros procedimentos descritos na literatura para a determinação de antimicrobianos de uma mesma família, as condições recomendadas não são únicas, verificando-se uma grande diversidade de composição do eletrólito, pH, temperatura, voltagem e outros. Neste sentido, para o desenvolvimento do método é importante avaliar os parâmetros de mobilidade eletroforética das espécies em estudo para direcionar a escolha do pH do eletrólito. Ainda, na CE as variáveis são dependentes entre si e, portanto, o uso de planejamentos experimentais para estabelecer as condições ótimas de análise é recomendado.

Os resultados obtidos demonstram que o método desenvolvido é adequado para realizar a determinação de SMX, CLF, CIPRO, ENRO, OTC, TC, DXC e CTC em formulações farmacêuticas com algumas vantagens frente a HPLC como: dispensa do uso de grandes volumes de solventes orgânicos, colunas analíticas, custo e simplicidade. Cabe ressaltar que o mesmo método de CE pode ser utilizado para os diferentes antimicrobianos no controle de qualidade de fármacos, o que leva a redução do custo e tempo de análise. No entanto, a robustez do método proposto é um parâmetro crítico e deve ser avaliado de forma rigorosa para garantir a confiabilidade dos dados gerados.

A eletroforese capilar atende todos os critérios de aceitação quanto aos parâmetros de validação preconizados pela ANVISA para ser empregado no controle de qualidade de fármacos em substituição e/ou complementação à cromatografia líquida de alta eficiência. Nesse sentido, seria interessante que métodos eletroforéticos fossem desenvolvidos e incluídos como monografias nas farmacopéias.

CAPÍTULO IV

Desenvolvimento de método para a determinação de multiresíduos de antimicrobianos em leite, usando a HPLC

IV.1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento de doenças em vacas leiteiras. Sua administração pode ser feita via intramamária, para o tratamento de mastite; por via parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea), na terapia de infecções; por via intra-uterina, para o tratamento de infecções uterinas, cervicais e vaginais, e por via oral, para o tratamento de doenças ou como suplemento alimentar, em doses subterapêuticas.

Os resíduos de antimicrobianos no leite de consumo pode representar riscos à saúde humana, podendo causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Alguns estudos sugerem que a presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos pode, também, ter um efeito adverso na flora intestinal humana, podendo prejudicar sua ação protetora local, além de propiciar a seleção de populações de bactérias resistentes (DENOBILO & NASCIMENTO, 2004).

Para monitorar os resíduos de antimicrobianos em leite, são comumente usados teste de triagem imunológicos e de inibição microbiológica, além de técnicas analíticas sensíveis e específicas para a identificação e quantificação de resíduos destes compostos em leite. Para a determinação de resíduos, o método de separação acoplado a espectrometria de massas é o mais indicado, embora a cromatografia líquida de alta eficiência com detector DAD esteja sendo comumente usada como alternativa, devido ao elevado custo do equipamento de espectrometria de massas (SHENCK & CALLERY, 1998).

IV.2 OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação simultânea de resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol e cloranfenicol em leite por cromatografia líquida de alta eficiência associada a detetor de arranjo de diodos (HPLC-DAD), e aplicar o método na determinação de resíduos dos antimicrobianos em leites comercializados na região de Campinas.

IV.3 EXPERIMENTAL

IV.3.1 EQUIPAMENTOS E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

As análises cromatográficas foram realizadas empregando um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA), composto por um sistema binário 1525; injetor 7725 (Rheodyne, EUA), com amostrador de 50 µL; detetor de arranjo de fotodiodos (DAD) 2996 (Waters, EUA). A aquisição de dados foi realizada mediante interface Millennium³² versão 4.0 e microcomputador Pentium III, 900 MHz, HD 20 G com impressora HP 640C (Hewlett Packard, EUA). Alguns estudos foram realizados em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA), composto de uma bomba de duplo pistão Waters 510; injetor 7725 (Rheodyne, EUA) com amostrador de 20 µL; detector UV-VIS 486 (Waters, EUA) e integrador Waters (EUA).

O banho de ultra-som USC 700 (Unique Thorton, Brasil) foi utilizado na degaseificação de fase móvel e no preparo de amostras. Membranas de 0,45 µm da Millipore (Brasil).

O pH das soluções foi ajustado com um pH-metro OP-271 (Digimed DM-20, Brasil), empregando um eletrodo de vidro combinado.

Para a separação das proteínas em etapas do preparo de amostras foi utilizada uma centrífuga Excelsius II (Fanem, Brasil).

A extração em fase sólida empregada no preparo de amostras foi realizada utilizando um sistema à vácuo (Alltech, EUA) com capacidade para 12 cartuchos.

IV.3.2 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

As colunas empregadas foram as seguintes:

Coluna analítica de fase reversa C₁₈ LiChroCART® 125 x 4,6 mm, 5 µm, LiChrospher® (Merck, Alemanha) e coluna de guarda C₁₈ Lichrocart® 6,0 x 4,0 mm (Merck, Alemanha); coluna octadecil híbrida (coluna X-Terra RP 18, Microsorb-MV) 250 x 4,6 mm, 5 µm (Waters, EUA) e coluna de guarda X Terra RP 18 Microsorb-MV, 20 x 3,9 mm, 5 µm (Waters, EUA).

IV.3.3 CARTUCHOS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

No preparo das amostras de leite foram empregados os seguintes cartuchos de extração: C₁₈ Bond Elut, 500 mg, 3 mL (Varian, EUA) e C₁₈ endcapped, 500 mg, 3 mL (Waters, EUA). Fase reversa polimérica, OASIS HLB, 200 mg, 6 mL (Waters, EUA) e fase reversa mista com trocador catiônico, Narc-2, 125 mg, 3 mL (J.T.Baker, EUA).

IV.3.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e no preparo de soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Foram utilizados Na₂HPO₄·7H₂O, EDTA sódico (Titriplex®), fosfato monossódico (NaH₂PO₄·2H₂O) e ácido acético da Merck (Alemanha), ácido cítrico da Nuclear (Brasil), ácido ortofosfórico da Chemo (Brasil) e hidróxido de sódio da LabSynth (Brasil). Ácido tricloroacético (ATCA) da Sigma (EUA), ácido clorídrico, CH₃COONa·3H₂O, acetonitrila e metanol foram da J.T. Baker (EUA). Acetonitrila e metanol foram solventes de grau cromatográfico (Tedia, Brasil).

IV.3.5 PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos utilizados foram hidrocloreto de tetraciclina 92,6 % (TC), sulfaquinoxalina sódica 95 % (SQX), sulfametazina 99 % (SMZ), sulfametoxazol (SMX) e enrofloxacina 99,7 % (ENRO), todos da Sigma (EUA). Os padrões oxitetraciclina diidratado 998 µg/mg (OTC), minociclina (MC), hidrocloreto de clortetraciclina 920 µg/mg (CTC) e cloranfenicol (CLF) foram da ICN Biomedical Inc. (EUA).

IV.3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES E FASE MÓVEL

As soluções estoque dos antimicrobianos de concentração de 1,0 mg mL⁻¹ foram preparadas a cada 90 dias, dissolvendo-se separadamente cada padrão analítico em metanol. As fluoroquinolonas foram dissolvidas com 2 % v/v de ácido acético. As soluções foram estocadas em freezer (-18 °C) e descongeladas anterior ao uso para o preparo das soluções de trabalho.

As soluções de trabalho dos antimicrobianos na concentração de 50 µg mL⁻¹ e abaixo desta concentração foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções estoque com água purificada em sistema Milli Q.

Para a HPLC foi usada, entre outras, fase móvel composta de tampão acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,035 mol L⁻¹ acrescida de Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹, nos pH: 5,0, 6,0, 6,5, 6,8, 7,0 e 7,3. O pH foi ajustado com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ ou ácido clorídrico 1 mol L⁻¹.

O tampão McIlvaine, pH 4, foi preparado a partir de 38,55 mL de Na₂HPO₄·7H₂O 0,2 mol L⁻¹ + 61,45 mL de ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹.

IV.3.7 PROCEDIMENTOS

IV.3.7.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS INICIAIS NA SEPARAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC

A separação dos antimicrobianos, pertencentes ao grupo das tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol foi baseada nas condições realizadas por HOUGLUM & LARSON, 1997. Estas condições foram modificadas, em vista que os autores a utilizaram para a determinação de CTC.

As condições iniciais de trabalho foram:

Fase estacionária: coluna C₁₈, LiChroCART® 125 x 4,6 mm, 5 µm, LiChrospher® (C₁₈ sílica).

Fase móvel: Fase aquosa (FA): 0,075 mol L⁻¹ CaCl₂ + 0,035 mol L⁻¹ acetato de sódio + 0,025 mol L⁻¹ de EDTA dissódico, pH 6,5.

Fase orgânica (FO): metanol.

Vazão: 0,7 mL min⁻¹.

Eluição por gradiente: 70:30 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-15 min) – 70:30 FA:FO v/v (15-20 min) – 70:30 FA:FO v/v (20-23 min).

A detecção foi realizada usando um detetor de arranjo de fotodiodos, sendo que para as sulfonamidas, cloranfenicol e tetraciclinas foram selecionados os seguintes comprimentos de onda 265, 311 e 385 nm, respectivamente.

IV.3.7.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

FASES ESTACIONÁRIAS

Foram realizados estudos nas colunas analíticas de fase reversa C₁₈ sílica e octadecil híbrida X-Terra RP 18, Microsorb-MV (C₁₈ híbrida).

ELUIÇÃO COM FASE MÓVEL

Foram realizados estudos empregando a fase estacionária C₁₈ sílica e os gradientes de eluição a seguir:

Gradiente I: 90:10 FA:FO v/v (0-3 min) – 50:50 FA:FO v/v (3-29 min) – 90:10 FA:FO v/v (29-39 min);

Gradiente II 90:10 FA:FO v/v – 75:25 FA:FO v/v (0-10 min) – 56:44 FA:FO v/v (10-30 min) – 90:10 FA:FO v/v (30-37 min);

Gradiente III: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) – 90:10 FA:FO v/v (30-37 min);

onde, FA: 0,075 mol L⁻¹ CaCl₂ + 0,035 mol L⁻¹ acetato de sódio + 0,025 mol L⁻¹ de EDTA dissódico, pH 6,5 e FO: metanol.

pH: foram estudados os pH 5,0, 6,0, 6,5, 6,8, 7,0 e 7,3 na coluna C₁₈ sílica.

- Fase móvel parte orgânica: estudos foram realizados em misturas de metanol:ACN, nas proporções de 65:35, 70:30, 75:25 e 80:20 v/v, tanto na coluna C₁₈ sílica, como na C₁₈ híbrida.
- Fase móvel parte aquosa: foram testados fosfato monossódico 0,010 mol L⁻¹, fosfato monossódico 0,010 mol L⁻¹ + EDTA 0,025 mol L⁻¹ e a mistura de fosfato monossódico 0,010 mol L⁻¹ + EDTA 0,025 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹ + CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹ + EDTA 0,025 mol L⁻¹, todos em pH 7 e eluição por gradiente (Gradiente I), realizados na coluna C₁₈ híbrida.

Como critério de seleção das condições otimizadas, quanto à composição da fase móvel, foram avaliados os seguintes parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico: fator de retenção (k), fator de separação (α), eficiência (N), resolução (Rs) e fator de assimetria (As).

IV.3.7.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE

Os antimicrobianos SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC, foram escolhidos para realizar o estudo de multiresíduos em leite em vista que eles são muito usados na prática veterinária, eles são de baixo custo e fáceis de encontrar no mercado.

Antes de validar o método cromatográfico desenvolvido, precisa-se realizar um estudo no que respeita ao preparo da amostra do leite, cabe destacar que esta matriz é muito complexa, devido à presença de grandes quantidades de proteínas, gorduras, vitaminas, entre outros interferentes.

IV.3.7.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE LEITE

Para os processos de extração, separação, limpeza e concentração dos antimicrobianos presentes na matriz leite, foram avaliados os seguintes preparos de amostra:

- A. Extração líquido-líquido a baixa temperatura (LLE-LT), utilizando como solvente extrator acetonitrila.
- B. Precipitação de proteínas seguida da LLE-LT, utilizando acetonitrila.
- C. Precipitação de proteínas seguida da extração líquido-líquido (LLE), utilizando hexano como solvente, seguida de extração em fase sólida (SPE) com cartucho C₁₈.
- D. Precipitação de proteínas seguida da extração em fase sólida, empregando fase reversa C₁₈ Bond Elut, 500 mg, 3 mL, fase reversa C₁₈ endcapped, 500 mg, 10 mL, fase mista com trocador iônico Narc-2, 125 mg, 3 mL com fase polimérica OASIS HLB, 200 mg, 6 mL .

Os procedimentos destes estudos estão apresentados na Tabela IV.1.

Tabela IV.1 Procedimentos de preparos das amostras de leite.

Preparo de amostra	Procedimentos
A	<ul style="list-style-type: none"> - 4 mL de leite* + 8 mL de ACN, agitar por 30 min - Congelar gradualmente a -18 °C por um mínimo de 6 horas - Filtrar o sobrenadante (membrana 0,45 µm) - Evaporar até secura - Ressuspender a 1 mL com fase móvel - Filtrar (membrana de 0,45 µm) e injetar no equipamento de HPLC
B	<ul style="list-style-type: none"> - 5 mL de leite* + 2,5 mL de ATCA 30 % v/v em água, agitar por 1 min - Centrifugar por 10 min a 861 g - Adicionar ao sobrenadante 10 mL de ACN - Agitar por 30 min - Congelar a -18 °C por um mínimo de 6 horas - Filtrar o sobrenadante (membrana 0,45 µm) - Evaporar até secura - Ressuspender a 0,5 mL com fase móvel - Filtrar (membrana de 0,45 µm) e injetar no equipamento de HPLC
C	<ul style="list-style-type: none"> - 5 mL de leite* + 2,5 mL de ATCA 30 % v/v em metanol - Agitar por 10 min em banho de ultra-som - Centrifugar por 20 min a 861 g e separar o sobrenadante - Adicionar ao resíduo 10 mL de tampão McIlvaine, pH 4 - Agitar por 10 min em banho de ultra-som - Centrifugar 10 min a 984 g, remover o sobrenadante e juntar ao sobrenadante anteriormente obtido - Adicionar 30 mL de hexano, agitar, deixar separar e descartar a fase orgânica - Aplicar a fase aquosa no cartucho SPE - Lavar com 10 mL de 3 % v/v de metanol em tampão McIlvaine, pH 4 - Eluir com 5 mL de metanol - Evaporar sob fluxo de N₂ a 30-35 °C até secura - Ressuspender em 0,5 mL de fase móvel - Filtrar (membrana de 0,22 µm) e injetar no equipamento de HPLC
D	<ul style="list-style-type: none"> - Igual ao procedimento C, excluindo a parte de extração com hexano

* Amostra branco ou fortificada com os antimicrobianos.

Foram testados vários solventes de precipitação das proteínas, tais como ácido tricloroacético (ATCA) 20 % e 30 % (FURUSAWA, 1999a), HCl 1 mol L⁻¹, ACN (MOATS & HARIK-KHAN, 1995) e tampão McIlvaine/EDTA (THOMAS, 1989).

Foram avaliadas as seguintes fases nos cartuchos SPE: fase reversa C₁₈ Bond Elut, 500 mg, 3 mL (procedimento C), fase reversa C₁₈ endcapped, 500 mg, 10 mL, fase mista com trocador iônico Narc-2, 125 mg, 3 mL (procedimento D) e fase polimérica OASIS HLB, 200 mg, 6 mL (procedimento D). Para tanto, foi empregado um sistema a vácuo com capacidade para 12 cartuchos.

As condições experimentais das etapas de condicionamento, lavagem, eluição e concentração estão apresentadas na Tabela IV.2. As etapas de condicionamento, lavagem e eluição foram avaliadas e otimizadas mediante alterações na composição da mistura de solventes e volume dos mesmos.

Os estudos realizados nas etapas de condicionamento, lavagem, eluição foram os seguintes:

Condicionamento: tampão McIlvaine pH 4 e 7.

Lavagem: estudo com 7,5 e 10 mL de água, 10 mL de água com 1 % de metanol, 10 mL de McIlvaine com 3 % de metanol e 10 mL de McIlvaine com 6 % metanol + 7,5% de ACN.

Eluição: foram testadas eluições com 5 mL de metanol, 15 mL de ACN, 5 mL de ACN com 20 % v/v de NH₄OH, 5 mL de metanol + 5 mL de ACN, 5 mL de metanol com 20 % v/v de ácido acético, 5 mL da mistura ACN:metanol (50:50, v/v) com 10 % v/v de NH₄OH, 5 mL de ACN com 20 % v/v de ácido acético e 3 mL THF + 3 mL metanol + 5 mL 1 % v/v de NH₄OH em ACN.

Tabela IV.2 Procedimentos experimentais empregado na etapa de extração em fase sólida.

Procedimento	Cartucho	Condicionamento	Lavagem	Eluição
A	C ₁₈	5 mL MeOH 5 mL Mcllvaine, pH 4	10 mL de Mcllvaine, pH 4 com 3 % v/v de MeOH	5 mL MeOH
B	C ₁₈ endcapped	5 mL MeOH 5 mL Mcllvaine, pH 4	10 mL de Mcllvaine, pH 4 com 3 % v/v de MeOH	5 mL MeOH
C	Narc-2 + C ₁₈	3 mL MeOH 3 mL Mcllvaine, pH 4	10 mL de Mcllvaine, pH 4 com 3 % v/v de MeOH	5 mL MeOH
D	OASIS HLB	5 mL MeOH 10 mL ACN 5 mL Mcllvaine, pH 4	10 mL de Mcllvaine, pH 4 com 6 % v/v MeOH + 7,5 % v/v de ACN.	5 mL MeOH

IV.3.7.3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE

CONFORMIDADE DO SISTEMA

Esta é a etapa inicial a ser estabelecida e é obtida, para os métodos cromatográficos, a partir de testes experimentais de conformidade do sistema que inclui os parâmetros: fator de retenção (k), fator de separação (α), resolução (R_s), número de pratos (N) e fator de assimetria (A_s). Como critério de aceitação foram tomados os seguintes valores: $1 < k < 10$; $1,1 < \alpha < 1,4$; $R_s > 2,0$; $N > 2000$, recomendados por SHABIR, 2003.

ESTABILIDADE DOS ANTIMICROBIANOS NO LEITE

Para avaliar a estabilidade dos antimicrobianos no leite, 10 amostras branco foram fortificados com 200 ng mL^{-1} de cada antimicrobiano (valor correspondente a duas vezes o LMR, exceto para o CLF)+ padrão interno (ENRO) 300 ng mL^{-1} . Duas

amostras foram analisadas imediatamente após preparo e as demais amostras foram estocadas a -18 °C e analisadas após 1, 2 e 4 semanas.

Para a validação do método para a determinação de SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC em leite foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), tendo com base as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2003) e Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/CE) (EC, 2002) para análise de resíduos em alimentos.

SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada após a exposição dos antimicrobianos SMX, SMZ, SQX, OTC, TC, CTC e CLF a condições de estresse por 60 min: meio básico (NaOH 0,1 mol L⁻¹), ácido (HCl 0,1 mol L⁻¹), oxidante (H₂O₂ 3 %) e temperatura a 55 °C. Todas as análises foram realizadas em duplicata e a concentração dos antimicrobianos foi de 1000 ng mL⁻¹. O objetivo foi determinar se os produtos de degradação interferem na determinação dos analitos mencionados, ou seja, se o método é capaz de diferenciar o analito do produto de degradação.

Também foram realizadas análises, em triplicata, de amostras branco (leite sem a presença dos antimicrobianos) com o objetivo de avaliar a presença de outras substâncias endógenas, produtos de degradação ou metabólitos que poderiam causar interferência na resposta de cada antimicrobiano.

A ANVISA segue as recomendações do FDA (FDA, 2001) e acrescenta que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20 % da resposta do limite inferior de quantificação.

CURVA ANALÍTICA

A curva analítica foi construída em duplicata (área do analito/área de ENRO) fortificando amostras de leite controle, nas concentrações de 60; 100; 200; 300 e 500 ng mL⁻¹ (faixa linear de trabalho). As diferentes concentrações foram preparadas a

partir de uma concentração de 1000 ng mL⁻¹. O padrão interno (ENRO) foi adicionado na concentração de 300 ng mL⁻¹ em cada um dos níveis de concentração.

LINEARIDADE E SENSIBILIDADE

A linearidade e sensibilidade foram calculadas a partir de regressão linear da curva analítica para SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC obtida anteriormente. A linearidade é expressa pelo coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

A ANVISA segue as recomendações do FDA (FDA 2001), e estipula que coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

Adicionalmente, foram construídos os gráficos de resíduos.

PRECISÃO

Precisão intra-ensaio: foi avaliada mediante análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de cinco amostras de leite fortificadas com uma concentração de 200 ng mL⁻¹ de cada antimicrobiano. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise em duplicata de três amostras de leite em 5 dias diferentes, fortificadas com concentrações de 100; 200 e 300 ng mL⁻¹ de cada antimicrobiano, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

A ANVISA recomenda que os resultados não excedam 15 % do RSD (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20 % do RSD).

EXATIDÃO

A exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação (nível de fortificação em 3 níveis). Para tanto, 5 mL de amostras branco foram adicionados de 500 µL de uma solução contendo SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC na concentração de 1000 ng mL⁻¹ (representando um nível de fortificação de 100 ng mL⁻¹ por mL de leite) e 1000 e 1500 µL de solução contendo todos os analitos anteriores na concentração de 1000 ng mL⁻¹ (representando os níveis de fortificação de 200 e 300 ng mL⁻¹, por mL

de leite). Ainda, foi adicionado 150 μL de uma solução de 300 ng mL^{-1} de ENRO (padrão interno) para cada nível de fortificação avaliado. As amostras fortificadas a um nível de concentração de 200 ng mL^{-1} foram avaliadas em quintuplicata no mesmo dia. As amostras fortificadas a níveis de concentração de 100, 200 e 300 ng mL^{-1} foram analisadas, em quintuplicata, em 5 dias diferentes.

Como critério de aceitação foi seguida a recomendação da Comunidade Européia (EC, 2002), que preconiza valores de exatidão na faixa -20 a 10% para esses níveis de concentração, o que representa uma recuperação no intervalo de 80 a 110% .

LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LOD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, em amostras branco nos respectivos tempos de retenção dos analitos. O LOD foi confirmado mediante análises de amostras branco fortificadas com o nível de concentração estabelecido (concentração de 20 ng mL^{-1}).

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LOQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, em amostras branco. O LOQ foi confirmado mediante análises de amostras branco fortificadas com o nível de concentração estabelecido (neste caso a concentração foi de 60 ng mL^{-1}).

IV.3.7.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LEITE

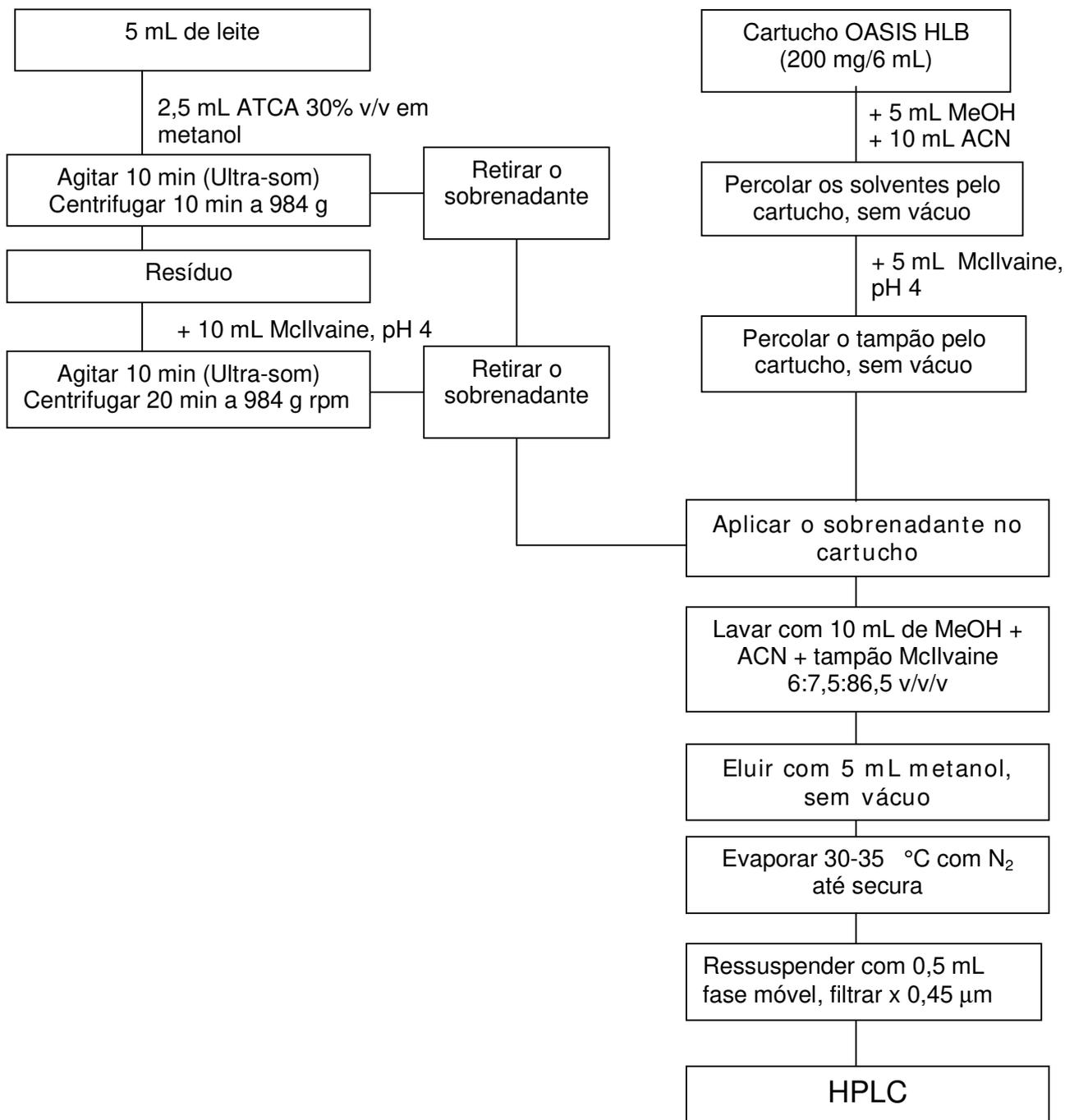


Figura IV.1 Procedimento de extração dos antimicrobianos do leite.

IV. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O desenvolvimento do método cromatográfico inicialmente foi baseado no método recomendado por HOUGLUM & LARSON (1997), para determinação de tetraciclinas em leite por HPLC que empregam, como fase estacionária a coluna C₁₈ e fase móvel: CaCl₂, EDTA sódico e tampão acetato a pH 6,5 como fase aquosa e como fase orgânica MeOH/ACN 35:65 v/v. No entanto, além das tetraciclinas, o método a ser desenvolvido neste trabalho deveria permitir a separação, na mesma corrida cromatográfica, de outras famílias de antimicrobianos comumente empregados na medicina veterinária (vacas leiteiras).

Além das tetraciclinas, foram avaliados antimicrobianos das famílias das sulfonamidas, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e cloranfenicol. Depois de diversos estudos empregando como fase estacionária colunas octadecil e variação na composição da fase móvel, verificou-se que seria viável separar em uma mesma corrida cromatográfica SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC e CTC. O comprimento de onda de máxima absorbância dos beta-lactâmicos se situa em torno de 230 nm. Neste comprimento de onda verifica-se a presença de muitos interferentes da matriz leite. Sendo assim, para a quantificação dos beta-lactâmicos, seria necessário realizar uma derivatização dos mesmos anterior à análise cromatográfica (TAKEBA e cols., 1998) para aumentar a detectabilidade dos analitos e aumentar a seletividade do método. Para as fluoroquinolonas, nas condições iniciais estabelecidas, não foi possível separar as mesmas em um tempo de até 30 min. Em decorrência destes fatos, os beta-lactâmicos e as fluoroquinolonas não foram incluídos no presente trabalho.

Para o desenvolvimento do método é importante conhecer as propriedades físico-químicas dos analitos, uma vez que estas irão determinar o tempo de retenção e fator de assimetria.

Muitos dos antimicrobianos sob estudo apresentam propriedades anfóteras. Quando as substâncias encontram-se ionizadas, a interação destas com a fase

estacionária na cromatografia reversa é diminuída, resultando em tempos de retenção curtos. No entanto, cabe ressaltar que além da distribuição de cargas na molécula, a polaridade da mesma influencia na afinidade pela fase estacionária. Assim sendo, na cromatografia em fase reversa, as moléculas apolares têm maior afinidade pela fase estacionária do que pela fase móvel (polar) e, portanto, apresentam, maior tempo de retenção do que moléculas polares.

Devido ao pH 7,0 da fase móvel, as sulfonamidas, em particular a SMX e SQX que apresentam um pKa em torno de 5,5, se encontram na forma ionizada (aniônica) e, portanto, apresentam um tempo de retenção menor do que a SMZ (pKa de 7,4).

As tetraciclinas, em pH 7, se encontram nas formas zwitteriônicas e em pequenas quantidades na forma ionizada (aniônica). No entanto, pela complexação com íons cálcio da fase móvel, as cargas são neutralizadas e, portanto, as tetraciclinas eluem em tempos maiores do que as sulfonamidas. A propriedade das tetraciclinas de formarem complexos estáveis com cátions multivalentes deve ser levada em consideração também para o desenvolvimento dos procedimentos de extração.

O cloranfenicol, em pH 7, se encontra na forma neutra e elui depois das sulfonamidas e as tetraciclinas.

ESTUDO DO GRADIENTE DE ELUIÇÃO

Devido ao número elevado de substâncias a serem separadas e às diferentes propriedades físico-químicas das diferentes famílias de antimicrobianos, foi verificado que, para permitir a separação de todos os analitos em uma única corrida cromatográfica, seria necessário o emprego da eluição por gradiente.

A fase móvel inicialmente empregada foi uma mistura de metanol (fase orgânica, FO) + acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Na}_2 \text{EDTA}$ $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (fase aquosa, FA) e a fase estacionária foi a C_{18} . Com essa composição e usando gradiente de eluição foi possível separar todos os antimicrobianos em estudo na mesma corrida cromatográfica. No entanto, quando foi empregada a amostra branco (amostra de leite na qual nenhum analito foi adicionada) observou-se, uma co-eluição de interferentes presentes na matriz no

tempo de retenção do CLF. Mesmo alterando o perfil do gradiente de eluição não foi possível separar todos os analitos dos interferentes. No sentido de alcançar a seletividade requerida, foi avaliado o emprego de uma mistura ternária, substituindo uma parte do metanol por ACN. Sendo assim, os estudos iniciais para a otimização do gradiente foram retomados usando-se uma nova fase móvel composta de 65:35 v/v MeOH:ACN + FA. Diferentes gradientes (Tabela IV.3) foram avaliados, empregando a coluna C₁₈ sílica. A fase aquosa era composta de acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹ e a fase orgânica MeOH:ACN, 65:35 v/v, pH 6,5 a vazão de 0,7 mL min⁻¹.

Tabela IV.3 Gradientes de eluição empregados para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, MC e CTC. Fase estacionária C₁₈ sílica.

Gradiente	Tempos (min)	% FA	% FO	Número de compostos separados	Tempo de retenção do último composto
A	0	70	30	8	15,1 min
	13	50	50		
	15	50	50		
	20	70	30		
	23	70	30		
B	0	85	15	8	17,5 min
	5	70	30		
	17	50	50		
	28	85	15		
C	0	90	10	8	28,5 min
	30	50	50		
	37	90	10		

FA: fase aquosa; FO: fase orgânica.

O estudo de gradiente para otimizar a separação dos antimicrobianos (8 compostos) foram realizados com padrões analíticos. No entanto, estudos com a

matriz foram realizados simultaneamente pelo qual foram testados vários gradientes, em vista que alguns analitos co-eluíam com interferentes da matriz. Com os três gradientes apresentados na Tabela IV.3, foi possível a separação dos 8 compostos, mas com o gradiente C se obteve uma melhor separação, ou seja resolução adequada dos analitos na matriz, especialmente para a família das sulfonamidas, que eluem em tempos de retenção menores (4-6 min).

Também foi estudada a influência do pH da fase móvel na separação dos antimicrobianos na coluna C₁₈ sílica. A fase móvel era constituída de fase aquosa acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹, fase orgânica MeOH (para este estudo ainda foi estudado só com MeOH e não a mistura com ACN). Quanto ao pH, foram avaliados os pH 5; 6; 6,5; 7 e 7,3. Considerando a separação de todos os antimicrobianos, o pH 7 se mostrou mais vantajoso para a separação dos analitos na coluna C₁₈ sílica (Tabela IV.4). Sendo assim, foi selecionado também o pH 7 para os estudos na coluna C₁₈ híbrida.

Tabela IV.4 Influência do pH da fase móvel no tempo de retenção dos antimicrobianos na coluna C₁₈ sílica.

pH	Tempo de retenção (min)							
	SMX	SQX	SMZ	CLF	OTC	TC	MC	CTC
5	14,5	16,0	22,5	*	*	*	*	*
6	11,5	15,0	19,8	21,0	*	21,9	25,0	26,5
6,5	8,0	14,0	17,2	20,0	*	22,1	25,5	26,5
7	6,0	13,5	16,3	20,2	13,5	22,5	25,5	26,5
7,3	5,5	13,0	15,5	20,5	13,5	22,5	25,5	26,5

MC: minociclina (padrão interno); (*) não eluíram até 30 min.

Segundo os resultados obtidos neste estudo, foi verificado que, para as sulfonamidas e o CLF, quanto menor o pH da fase móvel, maior é o tempo de retenção do analito (ver Figura IV.2). Enquanto o SMX apresenta um tempo de retenção de 6 min em pH 7, em pH 5 elui em aproximadamente 14,5 min. Os tempos de retenção para as tetraciclinas são pouco influenciadas pelo pH da fase móvel no

intervalo de 6 a 7,3. No entanto, como o tempo de retenção das sulfonamidas diminui com o aumento do pH, a SQX passa a co-eluir com a OTC nos pH de 7 e 7,3, o que não permite a separação de todos os compostos em uma única corrida cromatográfica.

A influência do pH no tempo de retenção dos analitos é decorrente do equilíbrio ácido-base. Em meio básico ($\text{pH} > 7$), os analitos ácidos ($\text{pK}_a < 7$) estão ionizados e, portanto, têm menos afinidade com a coluna apolar utilizada. Os valores de pK_a para os antimicrobianos sob estudo estão apresentados na Tabela IV.5.

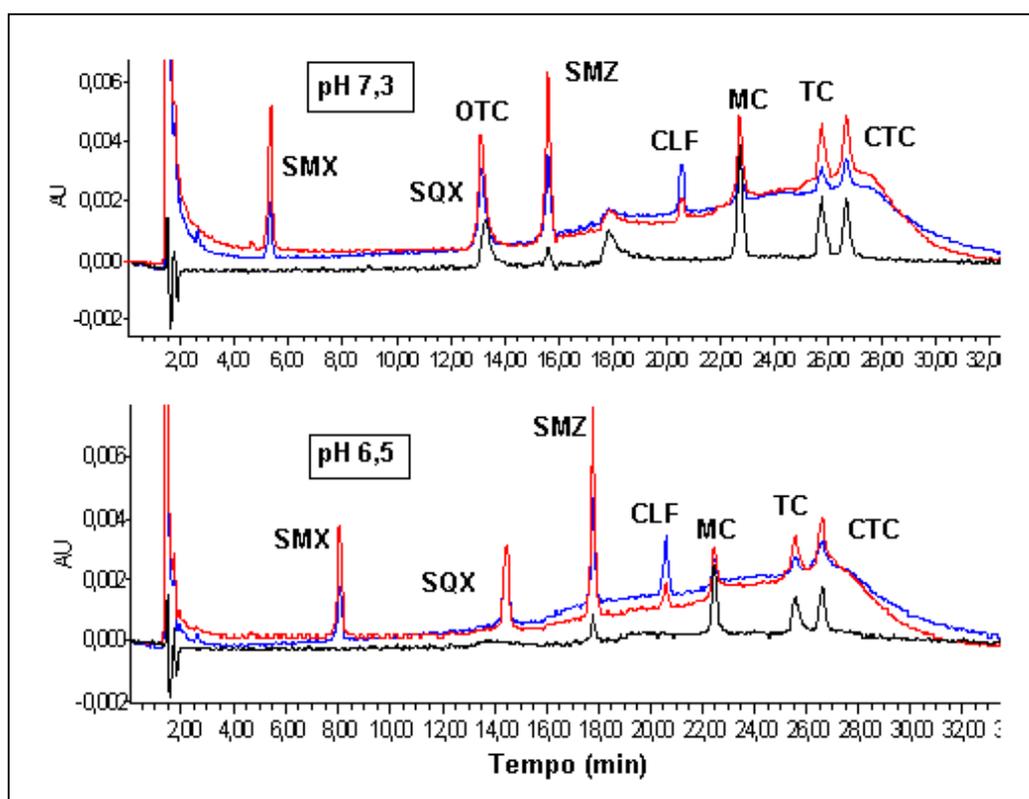


Figura IV.2 Cromatogramas da separação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC, MC e CLF, (500 ng mL^{-1}) em diferentes pH. A: pH 7,3 e B: pH 6,5. FE: C_{18} . FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$) e FO metanol. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 250 nm (vermelho), 278 nm (azul) e 385 nm (preto).

Tabela IV.5 Valores teóricos dos pKa dos antimicrobianos*.

Composto	pKa1	pKa2	pKa3	pKa4
SMX	5,6	-	-	-
SQX	5,5	-	-	-
SMZ	7,4	-	-	-
CLF	11,0	-	-	-
OTC	3,6	7,5	9,4	10,5
TC	3,4	7,4	9,6	12,1
CTC	3,6	7,5	9,9	10,4

(*) LIN e cols., 1997a; GOMEZ e cols., 2003; TAVARES & MCGUFFIN, 1994; BARRÓN e cols., 2001.

No pH 7,0 as sulfonamidas se encontram na forma de ânion, o CLF neutro e as tetraciclinas na forma zwitteriônica.

Considerando as condições cromatográficas até então estudadas (FE: C₁₈ sílica; FM: FA acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹, FO: metanol, pH 7; eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min) e vazão: 0,7 mL min⁻¹), continuamos com o estudo visando a otimização do método cromatográfico com intuito de separar o CLF do interferente, melhorando assim a seletividade. Neste sentido foi avaliada a proporção de MeOH e ACN na FO da fase móvel. As seguintes proporções de MeOH:ACN foram avaliadas: 65:35, 70:30, 75:25 e 80:20 v/v. A melhor proporção de fase orgânica utilizada para a coluna C₁₈ sílica foi de 65:35 v/v de MeOH:ACN, conseguindo separar todos os analitos dos inferentes da matriz leite (Figura IV.3).

Ainda foram comparadas as fases estacionárias C₁₈ a base de sílica e C₁₈ híbrida na separação dos antimicrobianos. A coluna C₁₈ a base de sílica apresenta problemas na separação de compostos básicos devido a presença de grupos silanóis residuais, além de não permitir o emprego de fases móveis com pH acima de 8. No entanto, a coluna C₁₈ híbrida apresenta grupos metila na fase estacionária e, em conseqüência, uma redução nos grupos silanóis residuais, pela qual adquire várias

vantagens como: ampla faixa de pH (pH 1-12) para a fase móvel, maior estabilidade e maior eficiência.

Nas mesmas condições anteriormente avaliadas, a coluna C_{18} híbrida apresentou melhores parâmetros cromatográficos na separação dos antimicrobianos em comparação à fase C_{18} (ver Figura IV.3 e IV.4), especialmente com o que diz respeito a OTC. Por este motivo a coluna C_{18} híbrida foi selecionada para os estudos subsequentes.

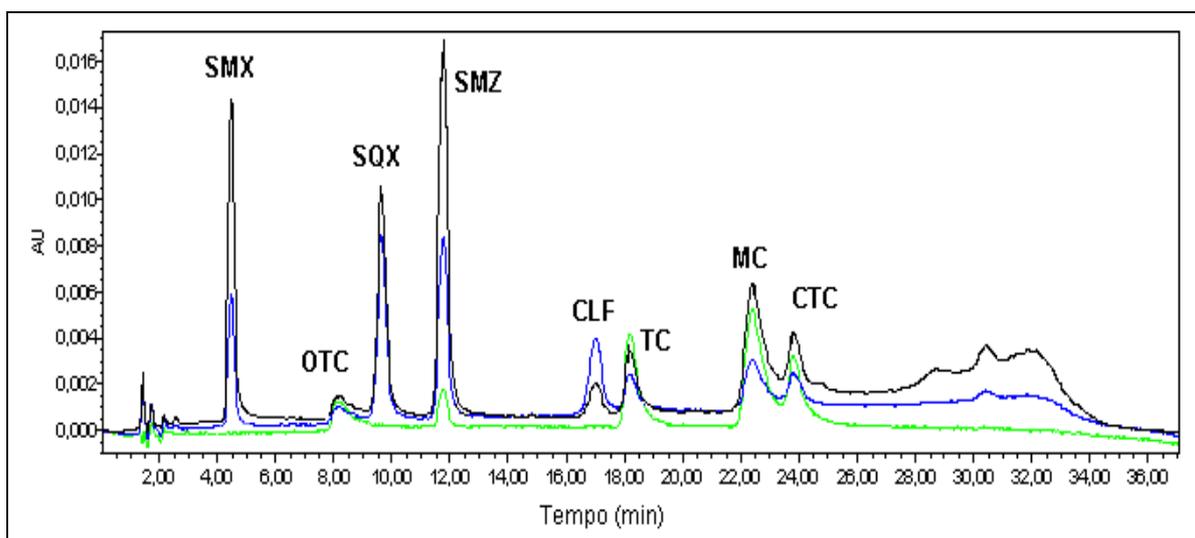


Figura IV.3 Cromatogramas da separação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC, MC e CLF, (500 ng mL^{-1}) com FE: C_{18} . FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7 e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 250 nm (preto), 278 nm (azul) e 385 nm (verde).

Como a eluição dos analitos na coluna C_{18} foi diferente na coluna C_{18} híbrida, resultando em co-eluições de alguns interferentes da matriz com os analitos, foram realizados novamente modificações na fase orgânica da fase móvel. As proporções avaliadas de MeOH:ACN foram 65:35, 75:25 e 80:20 v/v. Como resultado, teve-se que nas proporções de MeOH:ACN 65:35 e 80:20 v/v não houve separação do SMZ e TC, como mostram as Figuras IV.4 e IV.5, no entanto, na proporção 75:25 v/v foi obtida resolução adequada para todos os antimicrobianos em estudo.

Os tempos de retenção variam em função da proporção de MeOH e ACN, uma vez que os diferentes analitos têm afinidades diferenciadas pelos dois solventes. Por exemplo, a OTC tem maior afinidade pelo MeOH do que a ACN e o aumento de MeOH na fase orgânica diminui o tempo de retenção da mesma.

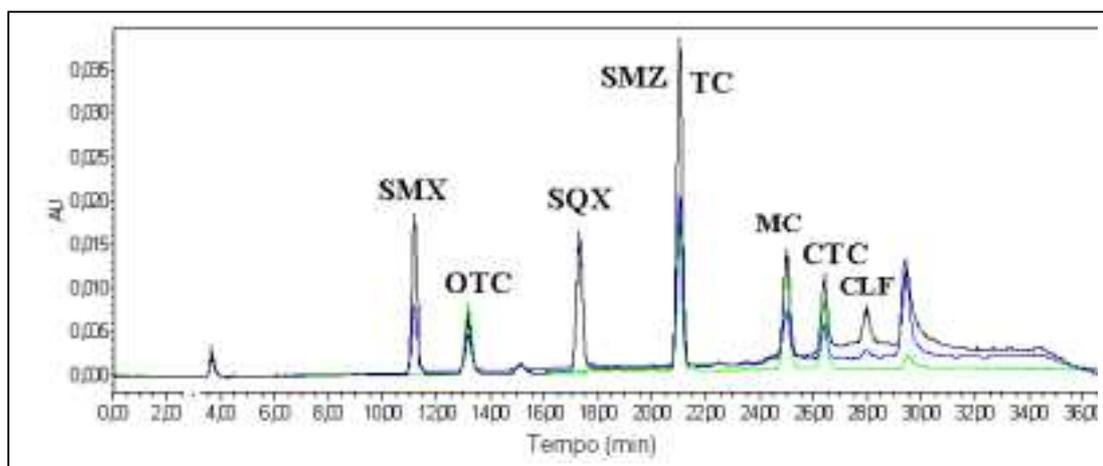


Figura IV.4 Cromatograma do estudo da fase móvel orgânica 65:35 v/v de MeOH:ACN na separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CLF e CTC. Com tempos de retenção de t_R 11,1; 13,2; 17,3; 20,9; 20,9; 24,9; 26,8 e 27,9 min, respectivamente, 1000 ng mL^{-1} . FE: C_{18} híbrida. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 250 nm (preto), 278 nm (azul) e 385 nm (verde).

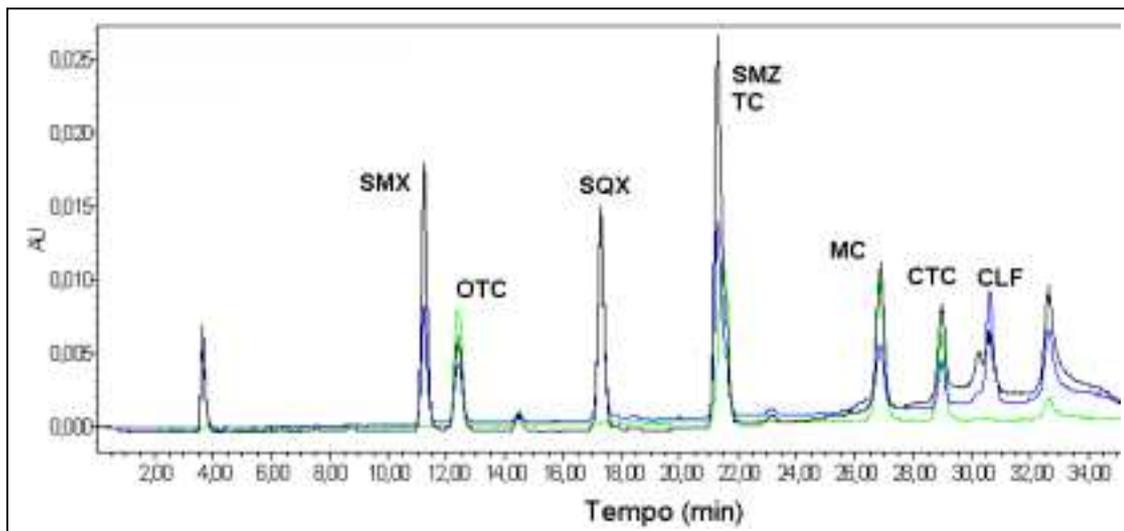


Figura IV.5 Cromatograma do estudo da fase móvel orgânica 80:20 v/v de MeOH:ACN na separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CLF e CTC. Com tempos de retenção de t_R 11,2; 12,4; 17,3; 21,3; 21,3; 26,8; 28,9; 30,6 min, respectivamente, 1000 ng mL^{-1} . FE: C_{18} híbrida. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 250 nm (preto), 278 nm (azul) e 385 nm (verde).

Como resultado dos estudos realizados até esta etapa, temos as seguintes condições otimizadas: fase aquosa: FA, acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ + CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$ + EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7, usando para a FO uma proporção de 75:25 v/v MeOH:ACN. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min) a uma vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

Nas condições otimizadas foi possível separar todos os analitos em estudo em uma única corrida cromatográfica (Figura IV.6).

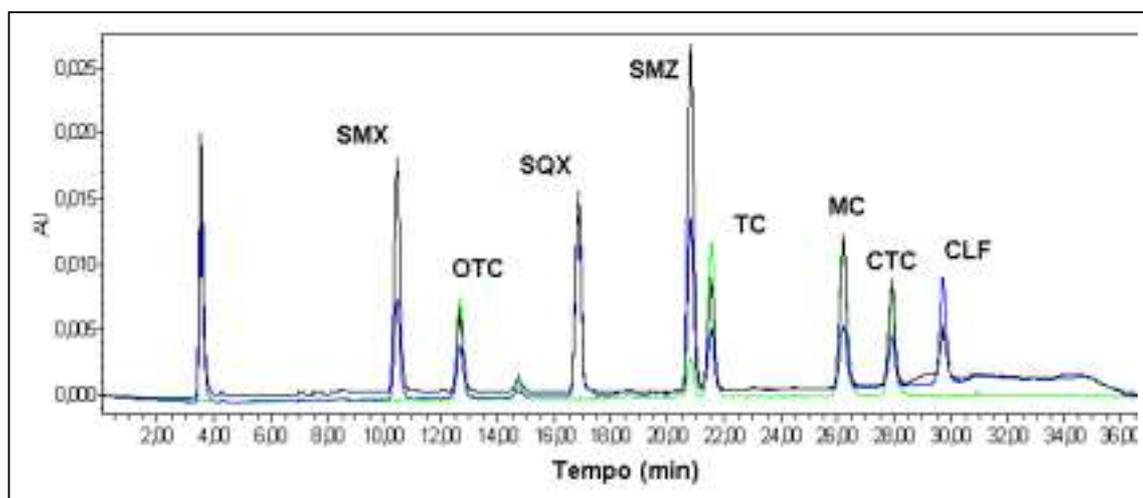


Figura IV.6 Cromatograma do estudo da fase móvel orgânica 75:25 v/v de MeOH:ACN na separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CLF e CTC. Com tempos de retenção de t_R 10,5; 12,7; 16,8; 20,8; 21,5; 26,2; 27,9; 29,7 min, respectivamente, 1000 ng mL^{-1} . FE: C_{18} híbrida. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 250 nm (preto), 278 nm (azul) e 385 nm (verde).

Considerando a grande quantidade de sais empregada na fase aquosa da fase móvel, o que afeta o sistema cromatográfico como um todo, foi avaliada a possibilidade da redução da concentração dos sais, assim como substituição por outros. Para avaliar a composição da fase aquosa foram testados os seguintes sais: diidrogenofosfato de sódio $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, diidrogenofosfato de sódio $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ + EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e a mistura de diidrogenofosfato de sódio $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ + EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ + CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$ + EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, todos em pH 7. A fase orgânica foi mantida na proporção 75:25 v/v MeOH:ACN e o gradiente 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min).

A última combinação da fase aquosa foi a recomendada para a determinação de CTC por HOUGLUM & LARSON (1997). Os autores utilizaram detecção por fluorescência, o que justifica o uso do cloreto de cálcio, uma vez que as tetraciclinas formam complexos fluorescentes com esse metal. Embora em nosso estudo tenha

vido usado o DAD, os resultados indicaram que a resolução dos picos é muito melhor ao se utilizar a combinação dos três componentes em comparação com as outras combinações estudadas. Na Figura IV.7 está apresentado o cromatograma obtido usando a fase móvel sem cálcio, no qual pode ser verificado um sinal de baixa intensidade para todas as tetraciclinas. A OTC e a MC tiveram seus tempos de retenção significativamente alterados pela presença de cálcio na fase móvel, sendo que o cálcio diminui o tempo de retenção destas. Cabe mencionar que as tetraciclinas complexam com metais tais com Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} , entre outros. Foi observado, também, que o CLF e a MC (padrão interno) co-eluíram na fase móvel sem cálcio.

Em resumo, as condições cromatográficas otimizadas foram FE: C_{18} híbrida, FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), FO 75:25 v/v MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$.

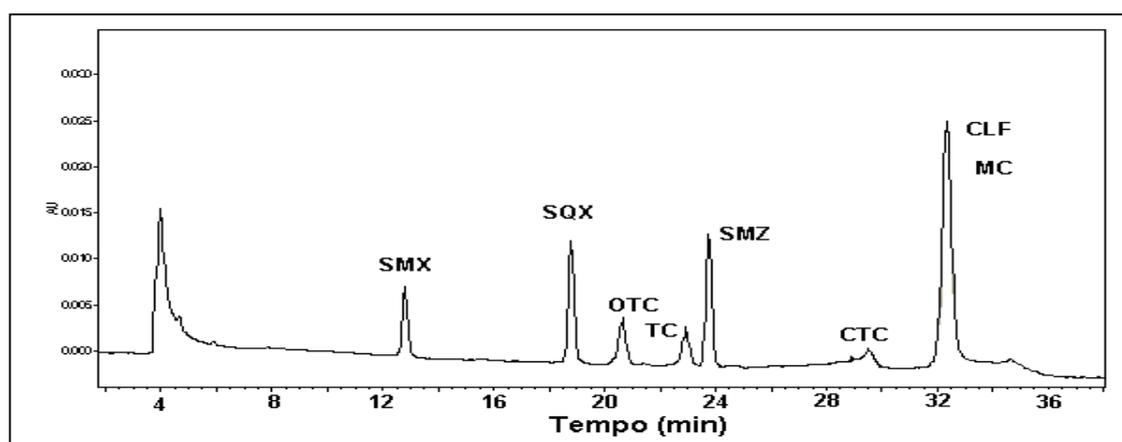


Figura IV.7 Cromatograma do estudo da fase móvel com fosfato de sódio $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ + EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, 75:25 v/v de MeOH:ACN, pH 7, na separação de SMX (t_R 12,8 min) SQX (t_R 18,8 min), OTC (t_R 20,6 min), TC (t_R 22,9 min), SMZ (t_R 23,7 min), CTC (t_R 29,5 min), MC e CLF (t_R 32,3 min), 1000 ng mL^{-1} . FE: C_{18} híbrida. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. O comprimento de onda usado foi 250 nm.

Depois de estabelecer as condições quanto a fase estacionária e composição da fase móvel, foram registrados cromatogramas nas condições otimizadas em

diferentes comprimentos de onda. Os comprimentos de onda foram selecionados baseados na obtenção do maior sinal, sendo estes valores no máximo de absorbância para cada família de antimicrobianos. Assim temos λ : 265 nm para as sulfonamidas, 311 nm para CLF e 385 nm para as tetraciclinas (ver Figura IV.8).

Cabe mencionar que a MC foi o primeiro padrão interno utilizado no desenvolvimento do método. No entanto, uma vez verificado que a eficiência de extração durante o preparo de amostra era baixa (aprox. 20 a 30 %), optou-se por procurar outro padrão interno. Como critério de seleção foi estabelecido que o padrão interno fosse estável, apresentasse eficiência de extração similar aos demais analitos e que não eluísse em tempos de retenção próximos aos analitos, ou outros interferentes da matriz. Ainda, o padrão interno não deveria ser indicado como medicamento de uso veterinário para vacas leiteiras. Foram testados vários compostos entre esses: norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, flumequina e ácido oxolínico. A enrofloxacin (ENRO), apresentou maior vantagem frente os demais compostos em relação aos critérios pré-estabelecidos.

Os cromatogramas contendo todos os antimicrobianos sob estudo, nos diferentes comprimentos de ondas, obtidos na coluna C₁₈ híbrida estão apresentados nas Figuras IV.9-11.

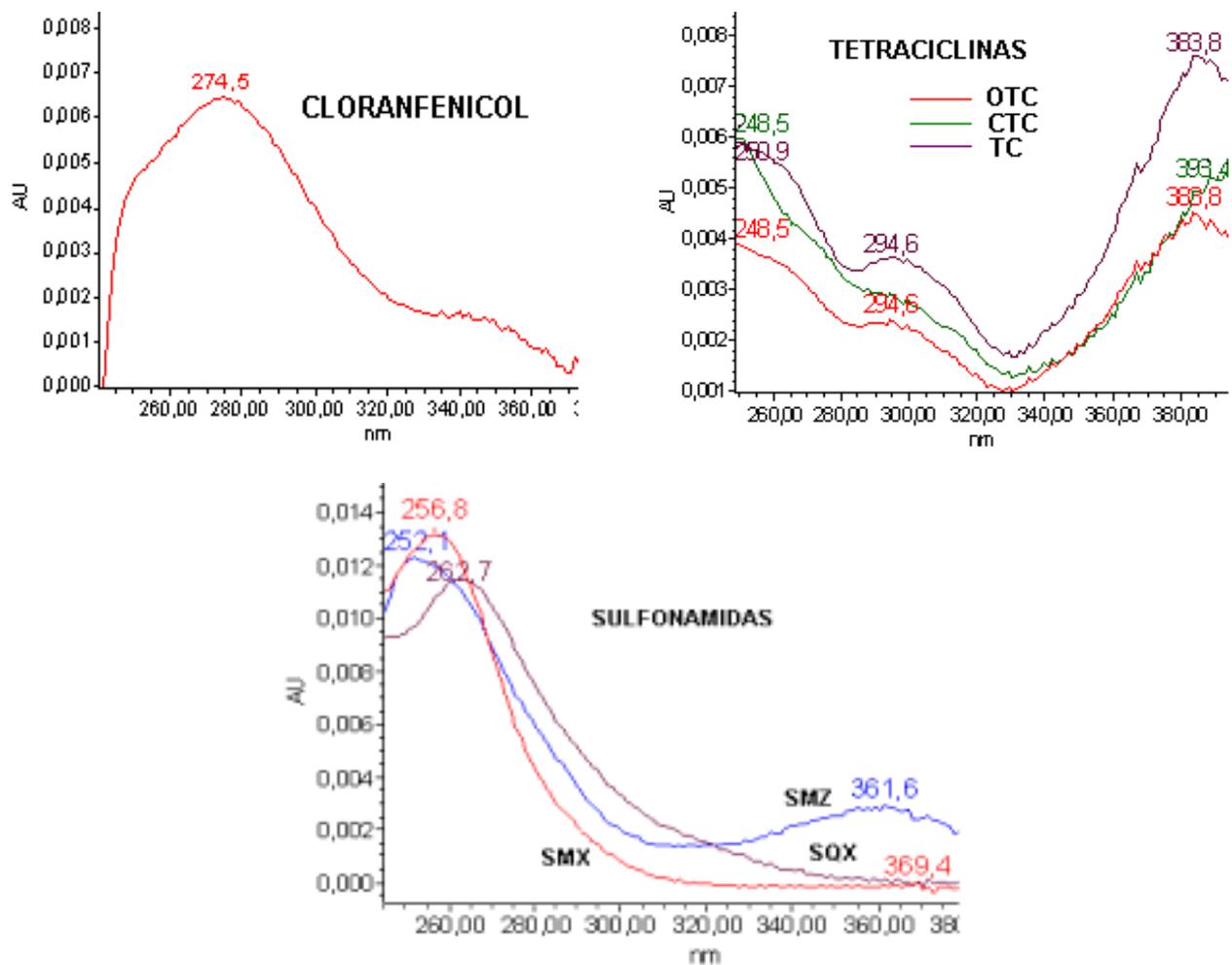


Figura IV.8 Espectros de cloranfenicol, tetraciclina e sulfonamidas determinados por HPLC com detector de arranjo de diodos.

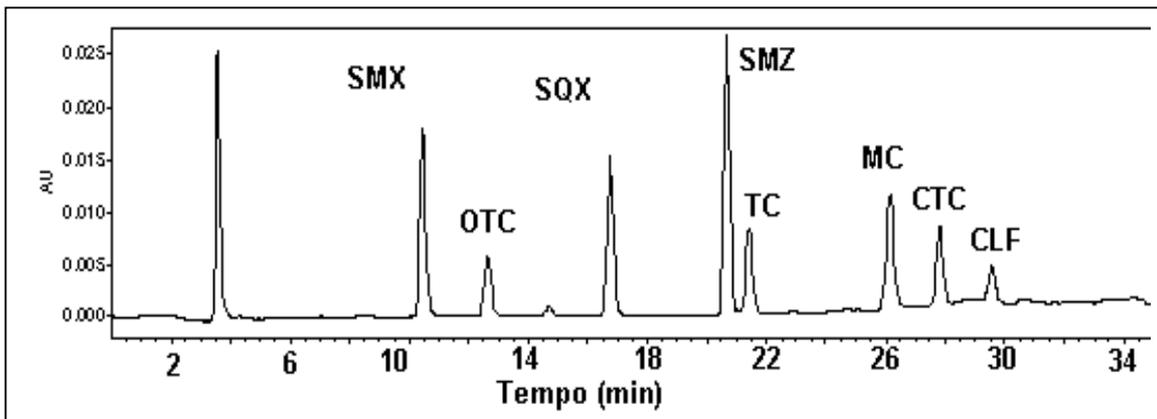


Figura IV.9 Cromatograma característico para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, CTC e MC (PI), 1000 ng mL⁻¹; λ : 250 nm. FE: C₁₈ híbrida. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) FO 75:25 v/v MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹.

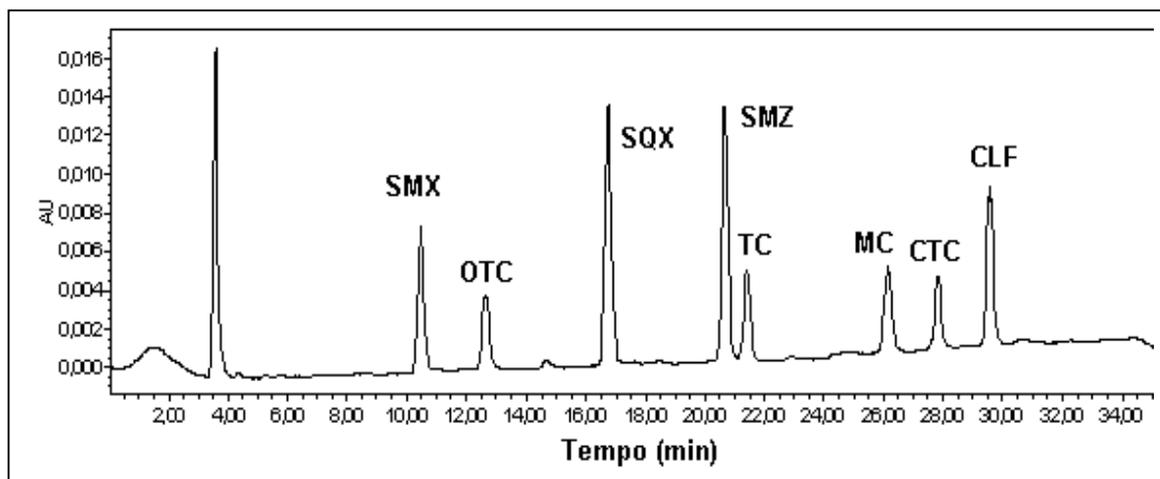


Figura IV.10. Cromatograma característico para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, CTC e MC (PI); 1000 ng mL⁻¹. λ : 278 nm. FE: C₁₈ híbrida. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) FO 75:25 v/v MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹

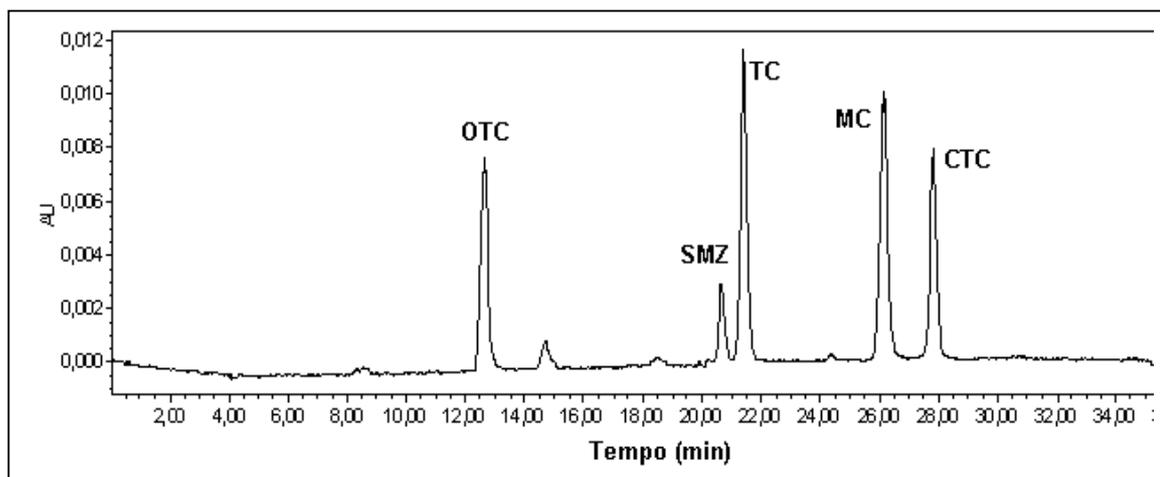


Figura IV.11 Cromatograma característico para a separação de SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, CTC e MC (PI); 1000 ng mL⁻¹. λ : 385 nm. FE: C₁₈ híbrida. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) FO 75:25 v/v MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹.

A partir dos cromatogramas obtidos nos diferentes comprimentos de onda e, considerando o nível de concentração dos antimicrobianos que seria necessário quantificar nas amostras de leite (concentrações menores do que 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, abaixo dos LMR), foi constatado que para cada família de antimicrobianos deveria ser avaliado o melhor comprimento de onda para garantir a detectabilidade requerida.

De todos os estudos realizados, a condição ótima estabelecida, levando em consideração os parâmetros de conformidade do sistema para a separação de SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, ENRO, CTC e CLF, foi de FE: C₁₈ híbrida, FM: FA= tampão acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, cloreto de cálcio 0,035 mol L⁻¹ e EDTA sódico 0,025 mol L⁻¹, pH 7; FO=MeOH:ACN, 75:25 v/v com a seguinte programação do gradiente de eluição: de 0 a té 30 min, 90/10 FA/FO v/v a 50/50 FA/FO v/v e de 30 a 37 min de 50/50 FA/FO v/v a 90/10 FA/FO v/v. λ : 265 nm, 311 nm e 385 nm.

Os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico estão apresentados na Tabela IV.6.

Considerando as condições ótimas (SHABIR 2003): $1 < k < 10$; $1,1 < \alpha < 1,4$; $R_s > 2,0$; $N/m > 8000$, observamos que os valores estabelecidos se encontram dentro dos valores aceitáveis.

Tabela IV.6 Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico.

Antimicrobianos	SMX	OTC	SQX	SMZ	TC	ENRO	CTC	CLF
Fator de retenção (k_1)	1,7	2,4	3,4	4,2	4,6	5,8	6,1	6,8
Número de pratos por metro (N) / m (mil)	10646	15964	33975	39053	44001	54118	50209	85293
Resolução (R_s)*	6,3	10,3	8,3	3,0	10,9	2,8	5,2	-
Fator de assimetria (A_s)	1,04	1,35	1,25	1,00	1,00	0,83	1,14	0,81
t_R (min)	10,7	13,4	17,6	21,0	22,9	27,2	28,6	31,0

(*) A resolução foi calculada entre dois picos adjacentes. FE: C_{18} híbrida, FM (FA): tampão acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, cloreto de cálcio $0,035 \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA sódico $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7; (FO) 75:25 v/v MeOH:ACN, com a seguinte programação do gradiente de eluição: de 0 a té 30 min, 90/10 FA/FO v/v a 50/50 FA/FO v/v e de 30 a 37 min de 50/50 FA/FO v/v a 90/10 FA/FO v/v. λ : 265 nm, 311 nm e 385 nm.

IV.4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE

IV.4.2.1 PREPARO DE AMOSTRA

Métodos analíticos que utilizam a HPLC para a determinação de antimicrobianos em alimentos requerem etapas prévias de preparo de amostra visando a eliminação de interferentes, extração e concentração dos analitos. Para tanto, têm sido empregados principalmente procedimentos de extração com solventes e/ou extração em fase sólida. LENTZA-RIZOS e cols. (2000, 2001)

relataram o uso da extração líquido-líquido à baixa temperatura (LLE-LT) para a extração de inseticidas organofosforados de azeite, com a vantagem do baixo custo e elevada eficiência de extração para analitos polares de matrizes lipofílicas.

Pela simplicidade da LLE-LT, esse procedimento foi avaliado para extração dos antimicrobianos no leite. O procedimento empregado está descrito na Tabela IV.1, na etapa de preparo de amostra. Empregou-se ACN como solvente extrator. Os analitos avaliados foram SMZ, SQX, SMX, CLF, OTC, TC, MC e CTC, adicionados à amostra branco fortificada na concentração de 500 ng mL⁻¹. Como resposta foi avaliada a eficiência de extração e repetibilidade dos resultados.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios para as tetraciclinas, uma vez que esses compostos não apresentam afinidade satisfatória com a acetonitrila.

Os cromatogramas referentes à amostra branco e amostra do leite fortificada estão apresentados na Figura IV.12. Pode-se observar, pelo elevado número de picos presentes na amostra branco, que esse preparo de amostra não é eficiente na eliminação de interferentes.

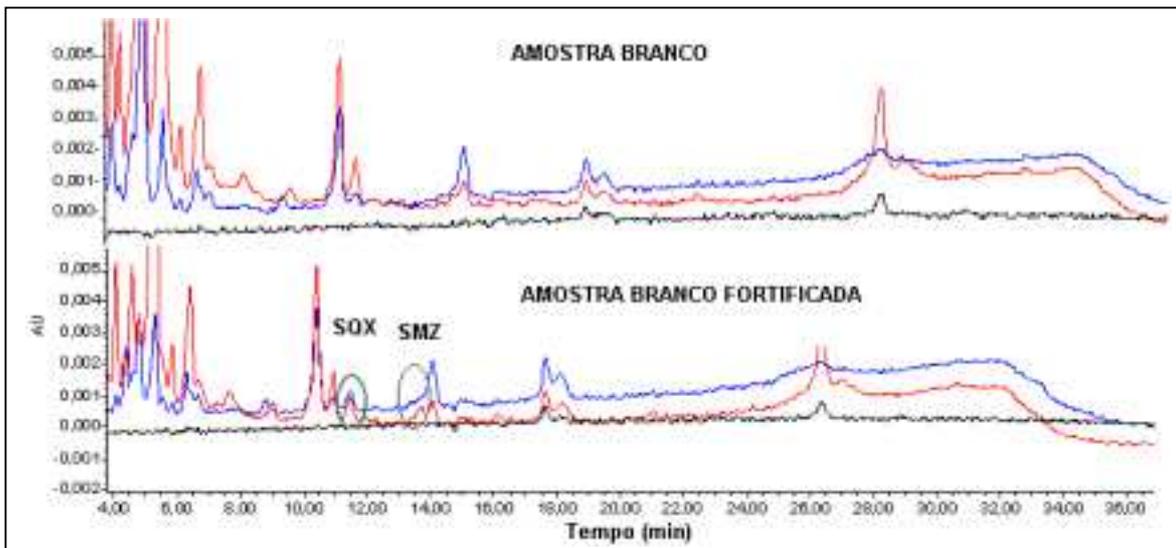


Figura IV.12 Cromatograma obtido para amostra branco e amostra branco fortificada com SMX, OTC, SQX, SMZ, TC, MC, CTC e CLF, após LLE-LT. Solvente extrator ACN. FE: C₁₈ híbrida, FM:FA (tampão acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, cloreto de cálcio 0,035 mol L⁻¹ e EDTA sódico 0,025 mol L⁻¹, pH 7); FO 75:25 v/v MeOH:ACN, com a seguinte programação do gradiente de eluição: de 0 a té 30 min, 90/10 FA/FO v/v a 50/50 FA/FO v/v e de 30 a 37 min de 50/50 FA/FO v/v a 90/10 FA/FO v/v. λ : 265 nm (vermelho), 311 nm (azul) e 385 nm (preto).

No intuito de promover uma eliminação mais eficiente dos interferentes, também foi avaliado o emprego da SPE com e sem prévia LLE usando hexano como solvente. A partição com hexano teve como objetivo extrair os componentes lipofílicos do leite anterior ao processo de extração em fase sólida. Os estudos iniciais foram realizados empregando cartuchos C₁₈, cujo procedimento está descrito na Tabela IV.2.

O preparo de amostra de LLE utilizando hexano anterior à SPE não resultou em eficiências de extração maiores em relação a SPE, exceto para a TC e OTC, onde uma pequena melhora foi observada (Tabela IV.7). No entanto, a utilização de solvente orgânico e o maior tempo de análise requerido não foi vantajoso em termos de eficiência de extração que justificasse o seu uso.

Tabela IV.7 Estudo de eficiência de extração (%) do leite fortificado com SMX, SQX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL⁻¹) em coluna C₁₈, com SPE e LLE + SPE.

Antimicrobianos	Eficiência de extração média* (%) ± d	
	SPE**	LLE (hexano) + SPE**
SMX	67 ± 3	64 ± 3
SQX	54 ± 4	52 ± 4
SMZ	45 ± 6	47 ± 3
CLF	70 ± 8	72 ± 4
TC	39 ± 6	51 ± 4
CTC	33 ± 5	53 ± 2

(*) Recuperação média (n= 2), (**) Cartucho C₁₈; d: desvio médio.

Nas Figuras IV.13, IV.14 e IV.15 estão apresentados os cromatogramas relativos ao preparo de amostra da matriz leite fortificada (nível de concentração de 1000 ng mL⁻¹) com os antimicrobianos, empregando extração com hexano seguida de SPE, nos comprimentos de onda característicos para cada família.

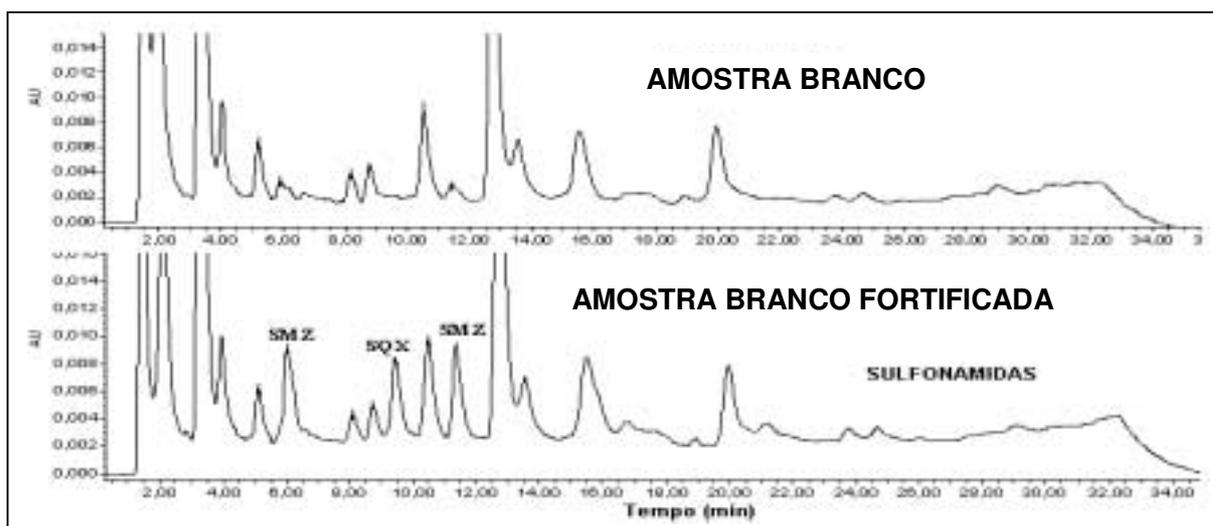


Figura IV.13 Cromatogramas característicos para amostra branco e amostra branco fortificada com SMX, SMX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL⁻¹) no preparo de amostra LLE + SPE. FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹), pH 7, FO 65:35 v/v MeOH:ACN. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 250 nm.

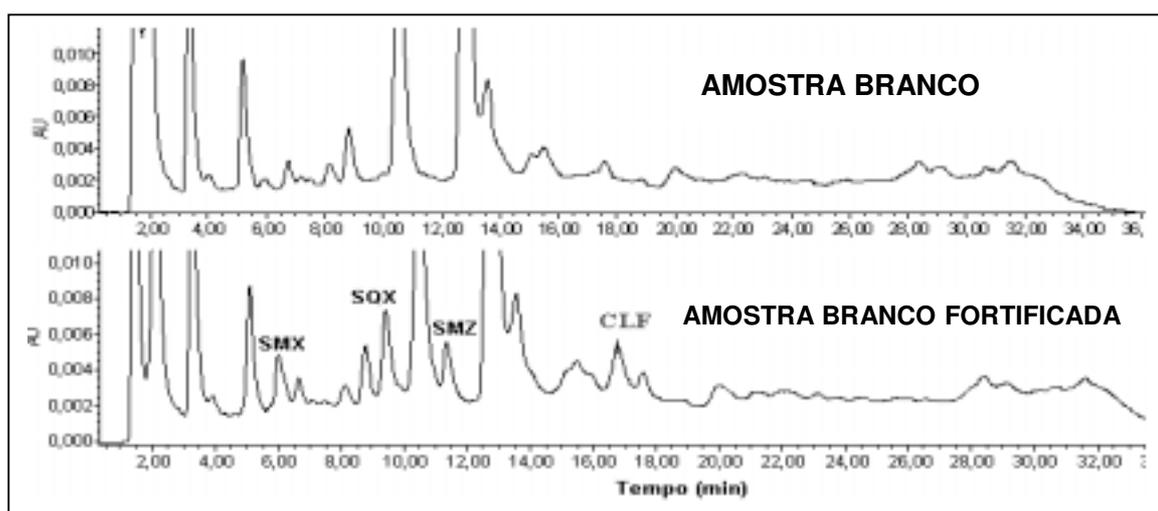


Figura IV.14 Cromatograma característico para amostra branco e amostra branco fortificada com SMX, SMX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL^{-1}), utilizando cartucho C_{18} no preparo de amostra LLE + SPE. FE: C_{18} . FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7, FO 65:35 v/v MeOH:ACN. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 278 nm.

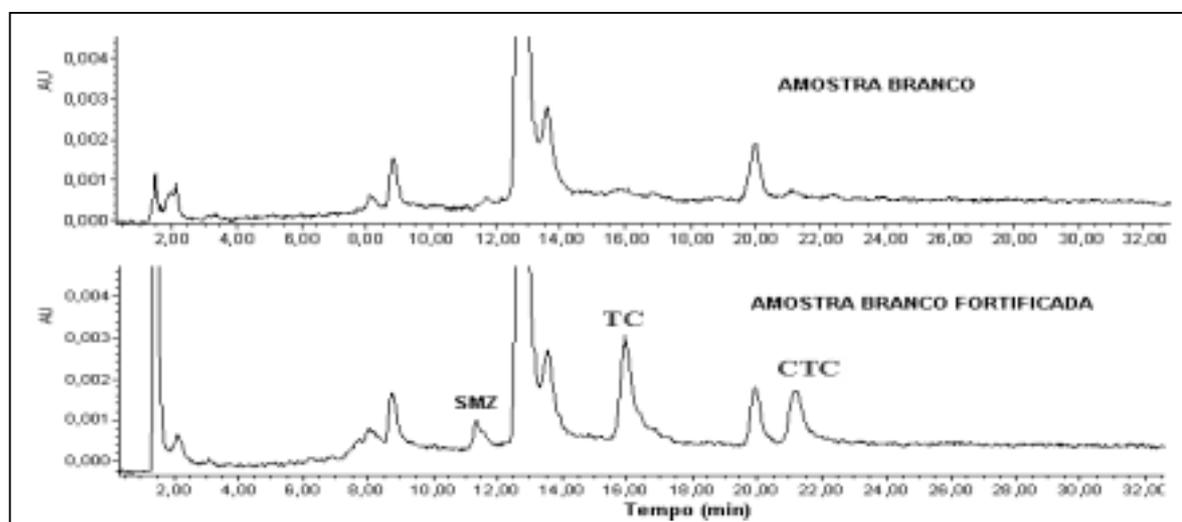


Figura IV.15 Cromatograma característico para amostra branco e amostra branco fortificada com SMX, SMX, SMZ, CLF, TC e CTC (1000 ng mL^{-1}), utilizando cartucho C_{18} no preparo de amostra LLE + SPE. FE: C_{18} . FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7, FO 65:35 v/v MeOH:ACN. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 385 nm.

Tanto usando apenas a SPE no preparo de amostra como a SPE associada a LLE com hexano, os resultados apresentam um número elevado de interferentes nos comprimentos de onda avaliados. Sendo assim, estudos adicionais se fizeram necessários.

Um das dificuldades existentes em isolar os antimicrobianos do leite está associada com a propriedade destes compostos de se ligarem às proteínas da matriz. Foram realizados estudos para precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (ATCA) 20 % (FURUSAWA, 1999), HCl 1 mol L⁻¹ e ACN (MOATS & HARIK-KHAN, 1995) e tampão McIlvaine/EDTA (THOMAS, 1989). Os melhores resultados da precipitação das proteínas foram obtidos com o ATCA. O valor adequado encontrado de ATCA foi 30 % em metanol, devido a sua maior capacidade em precipitar as proteínas do leite.

Ainda, avaliando a potencialidade do emprego da SPE na limpeza e concentração dos analitos, foram testados outros tipos de cartuchos, entre esses C₁₈, C₁₈ endcapped, cartucho de fase reversa mista com trocador catiônico (Narc-2) e cartucho OASIS HLB (copolímero). Os melhores resultados, levando em consideração a eficiência de extração de todos os analitos de uma amostra branco fortificada a um nível de concentração de 100 ng mL⁻¹, foram obtidas com os cartuchos C₁₈ endcapped e OASIS HLB (Tabela IV.8).

Tabela IV.8 Média da eficiência de extração (%) de amostras de leite fortificadas com os antimicrobianos (100 ng mL⁻¹), n=2.

λ	Analito	Eficiência de extração* (%)	
		Cartucho C ₁₈ endcapped	Cartucho OASIS HLB
265 nm	SMX	52	59
	SQX	10	60
	SMZ	26	21
385 nm	OTC	56	72
	TC	46	63
	CTC	34	50
311 nm	CLF	66	80

(*) A eficiência de extração foi calculada pela recuperação do analito de uma amostra branco fortificada em relação ao analito no solvente (curva analítica com padronização interna).

Nestes estudos, o nível de fortificação do leite foi reduzido em uma ordem de magnitude em relação aos estudos anteriores, uma vez que essa seria a concentração do LMR, exceto para o CLF que não tem LMR estabelecido, uma vez que é uma substância proibida. Cabe mencionar, que a eficiência de extração foi calculada em relação à resposta obtida para o analito presente na matriz leite fortificada em relação ao analito em solução padrão (calibração externa).

Pelos resultados obtidos com os cartuchos C₁₈ endcapped e OASIS HLB, verifica-se que não foi possível estabelecer uma condição única que permitisse uma recuperação adequada para todos os analitos, usando apenas um cartucho de extração em fase sólida. Assim sendo, o melhor compromisso entre recuperação e tempo de análise foi alcançado usando o procedimento descrito no item IV.3.7.4, utilizando o cartucho.

Ainda, foram realizadas diversas variações em cada uma das etapas do preparo de amostra até a otimização do processo de extração e concentração dos oito analitos, sendo que os principais fatores avaliados foram: tipo de precipitante de proteínas, misturas e volumes de solventes para lavagem do cartucho, concentração e tipo de solventes orgânicos na eluição do analito. Este último estudo foi uma das etapas mais efetivas na eliminação dos interferentes para a quantificação dos analitos. A Tabela IV. 9 mostra as eficiências de extração com três estudos de concentração de solventes orgânicos de eluição.

Os resultados da Tabela IV.9 nos mostram que o analito mais susceptível ao efeito de lavagem com solvente orgânico é a SMZ, devido a perda deste analito na etapa de lavagem. O uso da ACN baixa as recuperações das sulfonamidas, tendo em vista que este solvente é menos polar que o metanol. As misturas de MeOH e ACN nas proporções MeOH:ACN:tampão 6:7,5:86,5 v/v/v, foram as mais adequadas na recuperação dos analitos.

Tabela IV.9. Eficiências de extração para SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC, ENRO e CLF em diferentes estudos de eluição, usando cartucho OASIS HLB.

Antimicrobianos	Eficiência de extração* (%)			
	MeOH:ACN: tampão ^a 3:7:90 v/v/v	MeOH:ACN: tampão ^a 5:7:88 v/v/v	MeOH:ACN: tampão ^a 6:7,5:86,5 v/v/v	ACN:tampão ^a 8:92 v/v
SMX	64	61	59	22
SQX	48	57	60	52
SMZ	19	23	21	25
OTC	80	49	72	63
TC	64	63	63	62
CTC	61	59	50	58
ENRO	90	93	-	88
CLF	89	80	80	85

(*A eficiência de extração foi calculada pela recuperação do analito de uma amostra branco fortificada em relação ao analito no solvente (curva analítica com padronização interna); (a) tampão McIlvaine pH 4.

IV.4.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC E CTC EM LEITE

CONFORMIDADE DO SISTEMA

Os parâmetros da conformidade do sistema - número de pratos (N), fator de separação (α), fator de retenção (k), resolução (Rs) e fator de simetria (As) - estão de acordo com os critérios pré-estabelecidos e foram obtidos satisfatoriamente e estão apresentados na Tabela IV.6.

ESTABILIDADE

A avaliação da estabilidade das soluções utilizadas na metodologia analítica é de suma importância, já que uma degradação do analito ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados. Neste sentido, foram avaliadas as estabilidades dos antimicrobianos no leite durante a estocagem das amostras a -18°C num período de até 4 semanas. Amostras branco foram fortificadas com 200 ng mL⁻¹ e analisadas após uma, duas e quatro semanas, conforme descrito no Item IV.3.7.3.2. Os resultados estão

apresentados na Figura IV.16. Durante esse estudo as amostras foram congeladas em frascos diferentes, ou seja, nenhuma amostra foi congelada novamente após retirada para análise.

Como critério foi estabelecido que apenas variações maiores do que 20 % em relação a concentração inicial seriam considerados como efeito do processo de estocagem, uma vez que esse seria o desvio aceitável para o nível de concentração avaliado.

A partir destes resultados foi verificado que a OTC não é estável durante a estocagem à temperatura de -18 °C, tendo sido degradada em torno de 50 % após uma semana.

Depois da quarta semana de estocagem, os antimicrobianos que apresentaram maior porcentagens de degradação foram a SQX, SMZ e a OTC, com uma perda média do analito de 40 %, aproximadamente.

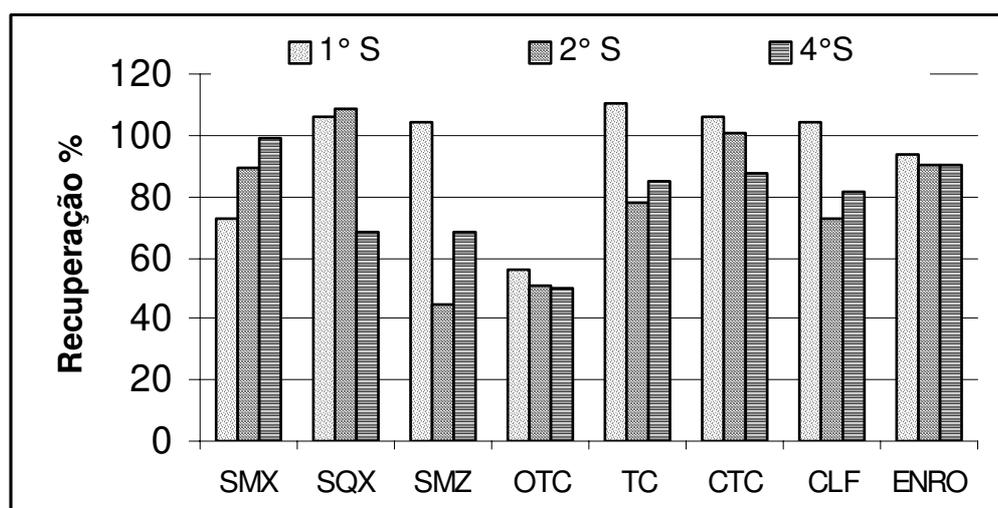


Figura IV.16 Estudo da estabilidade do leite fortificado, estocado a -18 °C. (S: semana).

Uma vez otimizadas as condições tanto na separação cromatográfica (fase estacionária e fase móvel), assim como no preparo de amostra para a determinação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC e CLF por HPLC, foram construídas curvas analíticas a fim de avaliar a adequação do método para a análise de resíduos dos

antimicrobianos em leite. Para isto foram determinados alguns parâmetros de validação, como: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão intra- e inter-ensaio e exatidão, tendo como base as recomendações da ANVISA, 2003 e Comunidade Européia (EC, 2002).

SELETIVIDADE

A seletividade tem como finalidade quantificar com exatidão os analitos na presença de interferentes presentes no leite. Estes interferentes podem ser produtos de degradação, substâncias endógenas e outros.

A seletividade foi avaliada tanto pelo estudo da degradação dos antimicrobianos ao serem submetidos a condições de estresse (meio ácido, básico, oxidante e temperatura), assim como pela análise de amostras branco, submetidas ao processo de extração descrito no item IV.1.6.2.3.

A Figura IV.17 apresenta os resultados de recuperação dos analitos após exposição às condições de estresse para os antimicrobianos em estudo. A partir desta figura, observa-se que o CTC e CLF são instáveis no meio básico e a OTC é instável no meio ácido. A OTC é degradada também na presença de peróxido de hidrogênio. As sulfonamidas em geral foram as mais estáveis nestas diferentes condições experimentais. Os produtos de degradação formados não afetaram a seletividade do método por que não eluíram nos mesmos tempos que os analitos em estudo. Todos os cromatogramas obtidos neste estudo são apresentados nos ANEXOS deste trabalho.

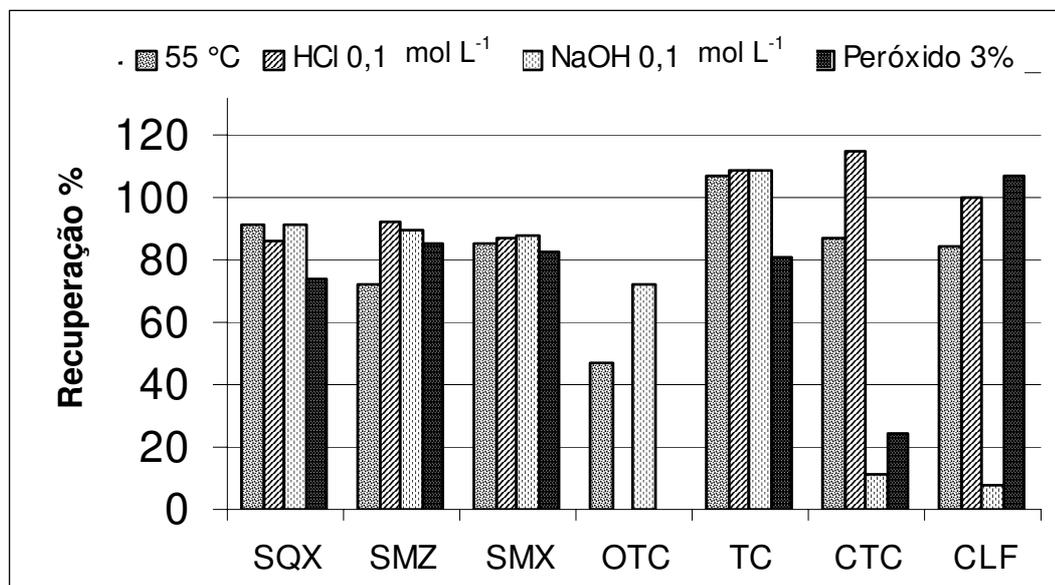


Figura IV.17 Estudo da degradação de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC e CLF, expressa como recuperação (%).

Continuando com o estudo da seletividade, foi verificada a presença de possíveis interferentes na matriz leite. Para tanto, 5 amostras branco foram submetidas ao preparo de amostra conforme descrito em IV.3.7.4 e analisadas. Os respectivos cromatogramas estão apresentados nas Figuras IV.18, IV.19 e IV.20. Na Figura IV.18 pode-se verificar a presença de picos não muito intensos próximos aos tempos de retenção dos analitos SMX (t_R 10,8min), SQX (t_R 17,3min) e SMZ (t_R 20,5 min), avaliados no comprimento de onda de 265 nm. No entanto, a presença destes compostos do leite não afeta a exatidão do método, uma vez que as recuperações foram na faixa de 96 a 99,4 %. Portanto, o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de SMX, SQX e SMZ em leite.

Na Figura IV.19 estão apresentados os cromatogramas da amostra branco e a amostra fortificada com ENRO e CLF. No tempo de retenção dos analitos não existem interferentes relevantes. A maior parte dos interferentes elui em tempos de retenção menores que 22 min. Portanto, os interferentes presentes no leite não interferem na determinação de ENRO e CLF no leite e o método desenvolvido

também apresenta seletividade adequada para estes analitos neste comprimento de onda (ver Figura IV.19).

Quanto as tetraciclinas, monitoradas no comprimento de onda de 385 nm, observa-se a presença de interferentes no intervalo de tempo de 18-20 min e de 29 min aproximadamente. Como os analitos de interesse OTC (t_R 13,4min), TC (t_R 22,0min) e CTC (t_R 28,3min) eluem em diferentes tempos, não foi constatada interferência de outros compostos presentes no leite (ver Figura IV.20).

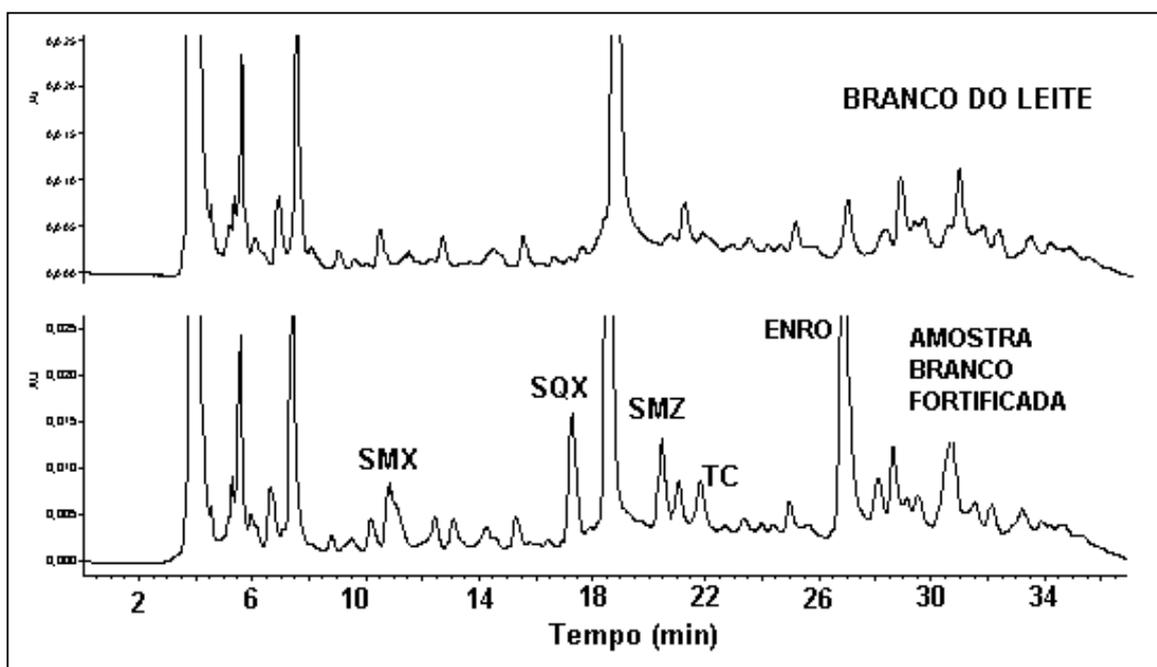


Figura IV.18 Cromatogramas da amostra branco e amostra branco fortificada com 100 ng mL^{-1} de SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC, CTC e ENRO (300 ng mL^{-1}), utilizando cartucho polimérico (OASIS HLB) no preparo de amostra por SPE. FE: C_{18} híbrida. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7, FO 75:25 v/v MeOH:ACN. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 265 nm (sulfonamidas).

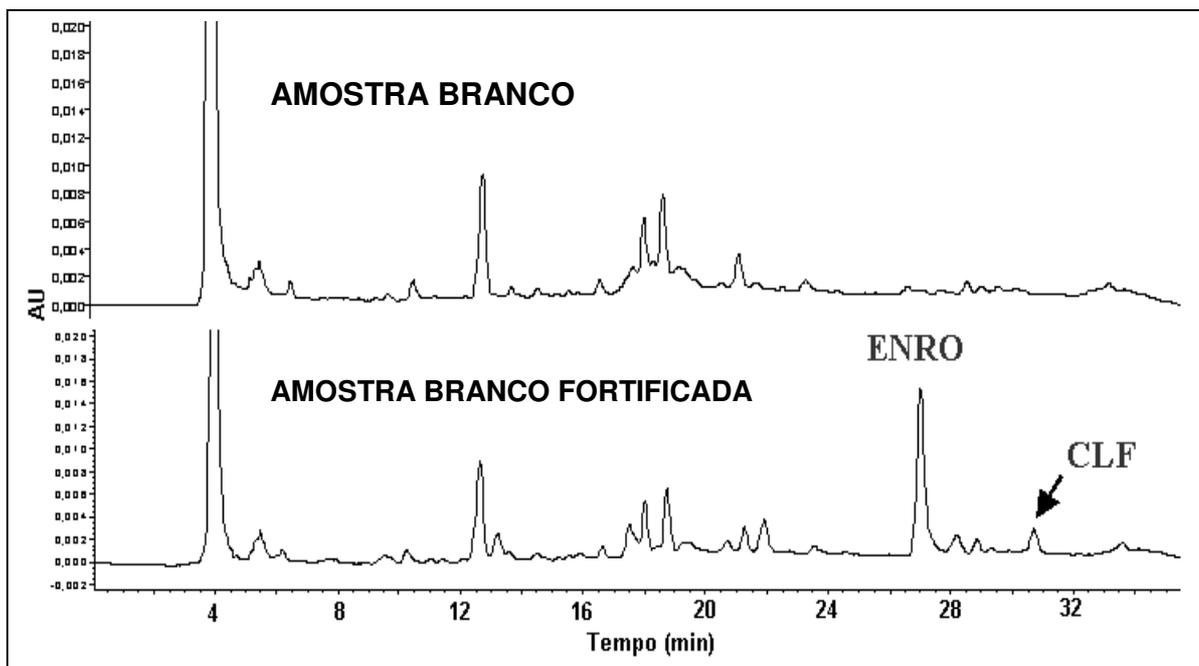


Figura IV.19. Cromatogramas da amostra branco e amostra branco fortificada com 100 ng mL^{-1} de SMX, SMZ, CLF, OTC, TC, CTC e ENRO (300 ng mL^{-1}), utilizando cartucho polimérico (OASIS HLB) no preparo de amostra por SPE. FE: C_{18} híbrida. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$) FO 75:25 v/v MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 311 nm (ENRO + CLF).

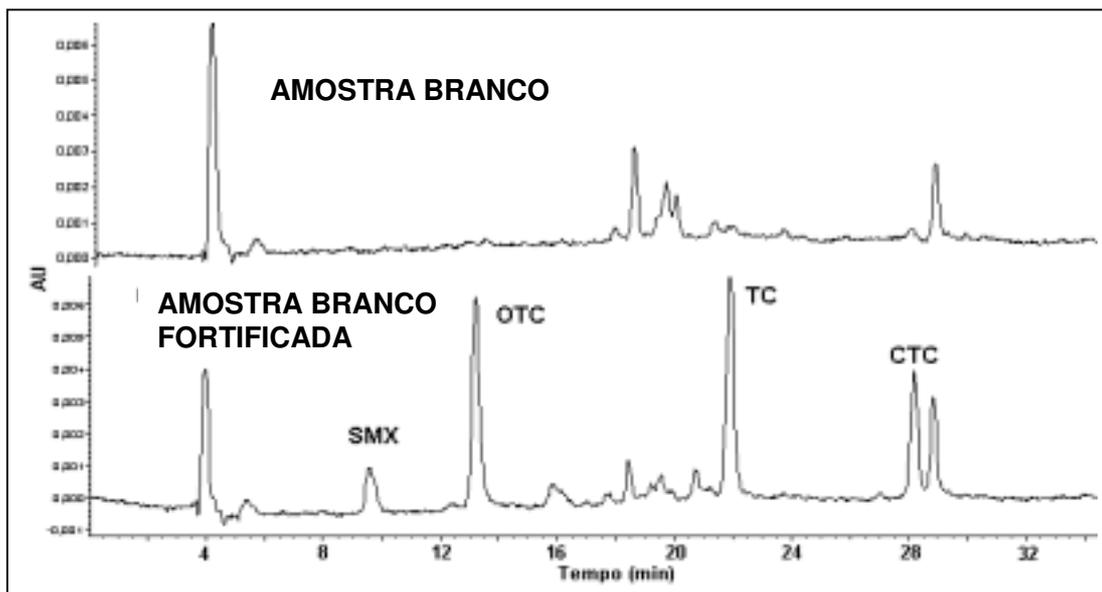


Figura IV.20 Cromatogramas da amostra branco e amostra branco fortificada com 100 ng mL^{-1} de SMX, SMZ, CLF, OTC, TC, CTC e ENRO (300 ng mL^{-1}), utilizando cartucho polimérico (OASIS HLB) no preparo de amostra por SPE. FE: C_{18} híbrida. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$) FO 75:25 v/v MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 385 nm (tetraciclinas).

A ANVISA segue as recomendações do FDA e preconiza que a reposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20 % da resposta do limite inferior de quantificação. Nossos resultados demonstram que os possíveis picos interferentes se encontram dentro do recomendado pela ANVISA.

CURVA ANALÍTICA

A curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. A linearidade determina até que ponto esta relação se mantém linear.

Mediante a curva analítica calcula-se os valores das concentrações do analito nas amostras, com base nos valores das áreas ou alturas dos picos cromatográficos.

Adicionalmente, a partir da curva analítica são calculados os outros parâmetros de validação.

As curvas analíticas foram construídas usando o procedimento de fortificação da matriz leite UHT, pelo método de padronização interna, plotando-se a razão entre as áreas de SMX/ENRO, SQX/ENRO, SMZ/ENRO, OTC/ENRO, TC/ENRO CTC/ENRO e CLF/ENRO versus concentração dos analitos (ver Figura IV.21). Para tanto, alíquotas de leite foram fortificadas em cinco níveis de concentração, 60, 100, 200, 300 e 500 ng mL⁻¹ e foram submetidas à análise conforme procedimento descrito no IV.3.7.4, em quintuplicata. Cabe mencionar que a ENRO foi escolhida como padrão interno, além de outras características mencionadas anteriormente, por ser este um antimicrobiano não recomendado para vacas leiteiras e apresentar um tempo de retenção diferente dos demais analitos. Em adição, a ENRO apresentou uma eficiência de extração semelhante aos demais analitos o que também qualifica essa substância para ser usado como padrão interno.

A ANVISA estipula que devem ser apresentados os coeficientes linear e angular, o intercepto da reta e que o coeficiente de correlação linear das curvas analíticas obtidas.

As equações das retas e os coeficientes de correlação linear (r) para os analitos em estudo são as seguintes:

SMX	Y= 0,0059X - 0,019	r= 0,998	λ= 265 nm
SQX	Y= 0,0073X - 0,174	r= 0,996	λ= 265 nm
SMZ	Y= 0,0029X - 0,067	r= 0,995	λ= 265 nm
CLF	Y= 0,0013X - 0,014	r= 0,998	λ= 311 nm
OTC	Y= 0,0027X + 0,090	r= 0,996	λ= 385 nm
TC	Y= 0,0034X + 0,053	r= 0,995	λ= 385 nm
CTC	Y= 0,0019X + 0,022	r= 0,992	λ= 385 nm

Onde, Y é a resposta em unidades de área e X é a concentração do analito em ng mL⁻¹.

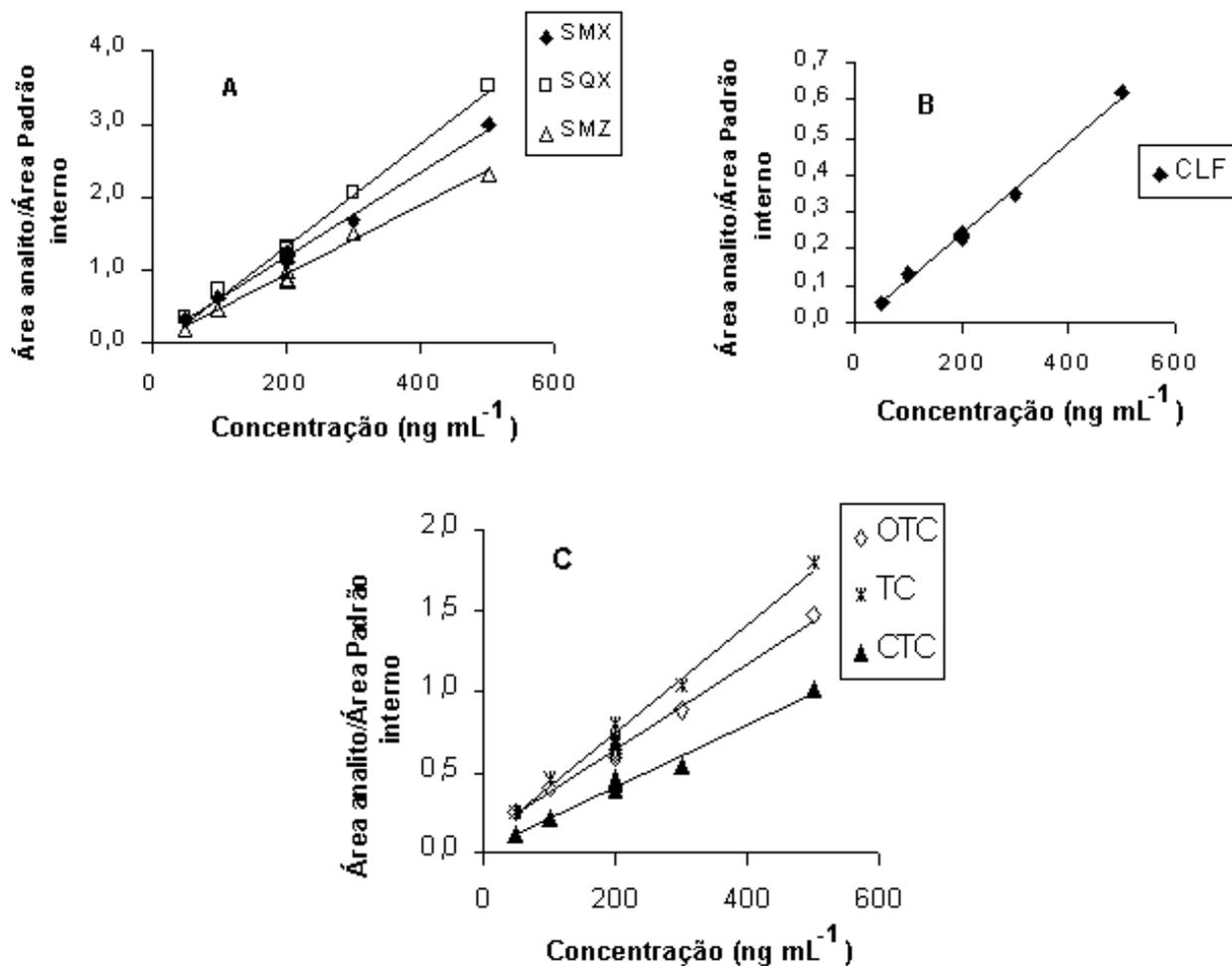


Figura IV.21 Curvas analíticas usando padrão interno para o grupo das A) sulfonamidas, B) cloranfenicol e C) tetraciclinas. O padrão interno utilizado foi a ENRO.

É importante otimizar o método para que o primeiro nível de concentração da curva analítica esteja abaixo do LMR (100 ng mL⁻¹), o que garante a capacidade do método para a determinação dos resíduos dos antimicrobianos na matriz leite.

FAIXA LINEAR, SENSIBILIDADE, LINEARIDADE

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito a qual o método pode ser aplicado. A faixa linear pode ser delimitada pelo

limite inferior de quantificação, que é na prática o limite de quantificação (LOQ) e o limite superior de quantificação. Neste estudo foi avaliada a faixa linear dinâmica, que é a faixa entre o LOQ e o último ponto da curva analítica, cumprindo o requisito que a linearidade teria que ser maior do que 0,98. Os resultados estão apresentados na Tabela IV.10.

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detetor varia em função da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta (inclinação) obtida a partir da regressão linear da curva analítica e os resultados estão sumarizados nas Tabela IV.10.

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais as concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica e é expressa pelo coeficiente de regressão linear. A ANVISA preconiza que o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

Cabe destacar que, para avaliar a linearidade do método analítico, os cálculos da regressão linear não são suficientes e se faz adequado avaliar também os valores dos resíduos (ver Figura IV.23). Se os valores dos resíduos estiverem aleatoriamente distribuídos ao longo da linha da regressão, então a linearidade está confirmada.

Os coeficientes de correlação obtidos (Tabela IV.10) foram superiores aos recomendados e os gráficos de resíduos confirmam estes resultados. Estes e outros parâmetros de validação para a determinação de SMX, SQX, SMZ e CLF e OTC, TC e CTC em leite estão apresentadas na Tabela IV.10.

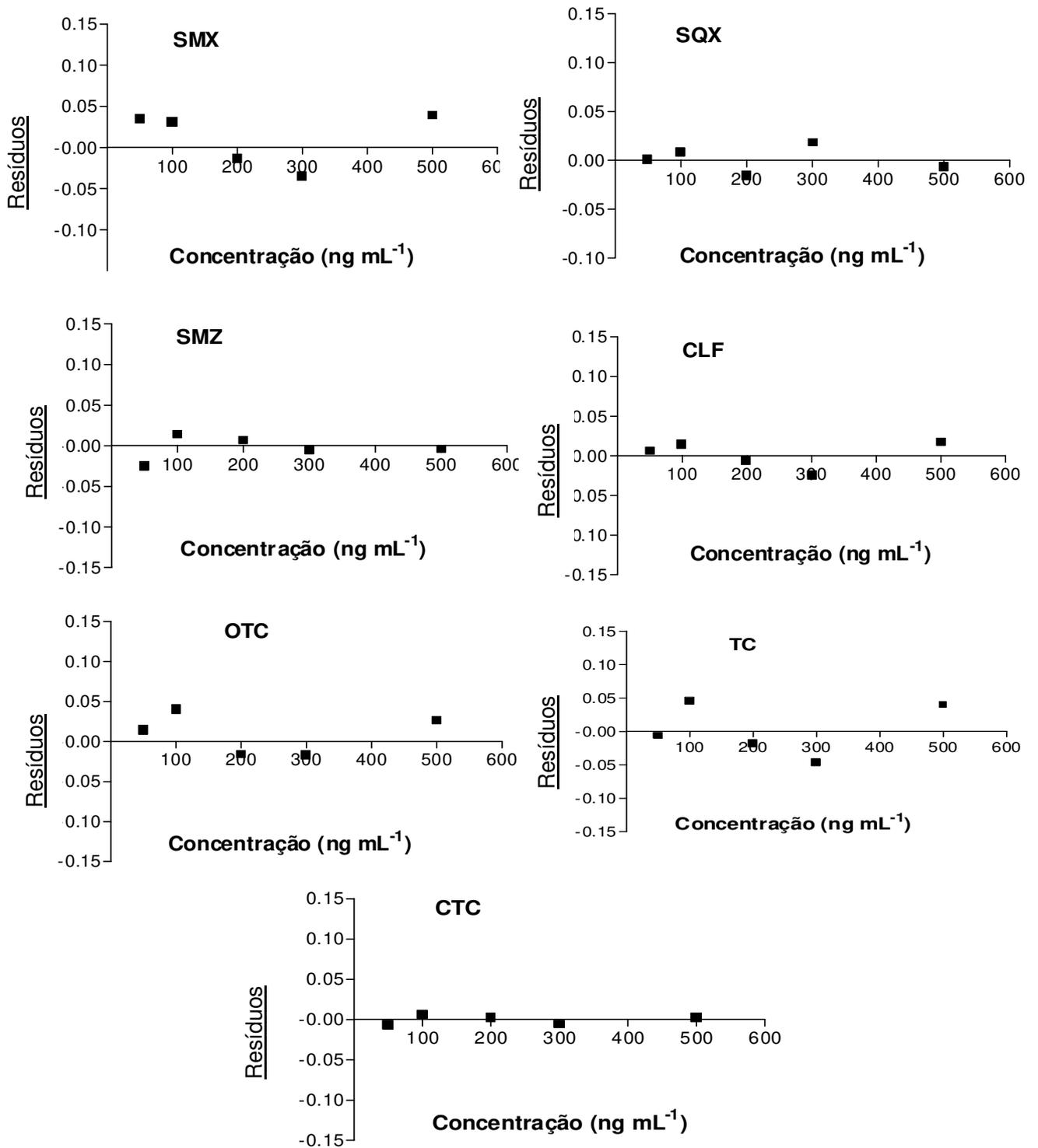


Figura IV.22 Gráficos de resíduos para SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC.

Tabela IV.10. Parâmetros de validação para SMX, SQX, SMZ e CLF em leite.

Parâmetros	SMX	SQX	SMZ	CLF	OTC	TC	CTC
Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	60-500	60-500	60-500	60-500	60-500	60-500	60-500
Sensibilidade (ua mL ng ⁻¹) (P<0,05)	0,0058 ±0,0002	0,0072 ±0,0002	0,0020 ±0,0001	0,00120 ±0,00003	0,002700 ±0,000009	0,0034 ±0,0001	0,0019 ±0,0001
Linearidade (r)	0,998	0,996	0,995	0,998	0,996	0,995	0,992
Coeficiente linear	-0,019	-0,174	-0,067	-0,014	0,090	0,053	0,022
Precisão Intra-ensaio (RSD %), n=5 200 ng mL ⁻¹	6,5	3,9	3,1	2,6	3,9	4,9	2,7
Precisão Inter-ensaio (RSD %)							
100 ng mL ⁻¹ , n=5	8,1	5,4	13,2	7,4	15,8	6,4	6,0
200 ng mL ⁻¹ , n=5	4,8	9,0	7,1	7,3	14,6	10,0	7,1
300 ng mL ⁻¹ , n=5	12,5	7,6	15,6	8,3	5,4	10,0	12,7
LOD (ng mL ⁻¹)	20	20	20	20	20	20	20
LOQ (ng mL ⁻¹)	60	60	60	60	60	60	60

RSD: estimativa do desvio padrão relativo, LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação. ua: unidades de área.

PRECISÃO

A precisão é um termo geral que representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. A precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade e reprodutibilidade (INMETRO, 2007). O resultado é dado em forma da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) quando um número significativo de repetições é realizado.

Segundo o FDA a precisão pode ser subdividida em intra-ensaio e inter-ensaio (FDA, 2001).

A precisão intra-ensaio foi avaliada mediante análise em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e analista, de cinco amostras de leite fortificadas com uma concentração de 200 ng mL⁻¹. O RSD para todos os antimicrobianos ficou na faixa de 2,6 a 6,5 % (Tabela IV.10).

A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise de amostras de leite fortificadas em três níveis de concentração (100; 200 e 300 ng mL⁻¹) em 5 dias diferentes, em duplicata, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A precisão (RSD) para todos os antimicrobianos foi na faixa de 4,8 a 15,8 % (Tabela IV.10).

A ANVISA recomenda que os resultados da precisão (RSD) não excedam 15 % (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20 %).

Segundo a Comissão Européia (European Commission Decision 2002/657/EC, 2002) nos níveis de concentração de resíduos até 100 ng mL⁻¹, uma variação máxima de 23 % é aceitável.

As estimativas dos desvios padrão relativos obtidos (ver Tabela IV.10) não foram superiores a 23 %. Portanto, pode-se considerar que a precisão do método está de acordo com as recomendações das agências reguladoras (ANVISA e CE).

EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO

A exatidão mede o quanto o valor obtido na análise está próximo do valor verdadeiro presente da amostra, e pode ser determinada através da análise de materiais certificados, fazendo-se a comparação entre dois métodos, sendo um deles, o método oficial ou de referência, ou então, através de testes de recuperação,

onde quantidades conhecidas do analito são adicionadas a matriz amostra (processo conhecido como fortificação). A porcentagem de recuperação é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação.

As análises são realizadas conforme procedimento estabelecido e as respectivas concentrações experimentais calculadas pela curva analítica. A porcentagem de recuperação (exatidão) é obtida pela Equação IV.1:

$$\text{Recuperação}(\%) = 100 \left(\frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \right) \quad \text{Equação IV.1}$$

Uma vez que não existe material de referência certificado disponível, a exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, amostras branco foram fortificadas na concentração de 200 ng mL⁻¹ de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC e CLF. As amostras foram analisadas em quintuplicata no mesmo dia. Também foram avaliadas recuperações em três concentrações diferentes (100, 200 e 300 ng mL⁻¹) dos mesmos analitos em 5 dias diferentes (Tabela IV.11).

ANVISA recomenda que o RSD não deva exceder 15 % exceto para o nível de fortificação no LOQ para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20 %.

A EC apresenta requerimentos mínimos para os valores de exatidão dos métodos quantitativos de análise de resíduos em alimentos, que variam conforme a concentração de interesse da substância alvo, para concentrações residuais do analito >10 µg kg⁻¹ recomenda uma variação na recuperação de 80 a 110 %.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV.11. As porcentagens de recuperação nos níveis de fortificação avaliados em um mesmo dia, variam na faixa de 96 a 103 %, os quais demonstram que estes valores se encontram de acordo com os estipulados tanto pela ANVISA, assim como pela Comissão Européia, Diretiva 2002/657/CE, confirmando a exatidão do método.

A recuperação avaliada em 5 dias diferentes variou de 83 a 112 %.

Tabela IV.11 Recuperações (%) de SMX, SQX, SMZ, CLF, OTC, TC e CTC de amostras branco fortificadas em diferentes níveis de concentração e análise em diferentes dias.

		Recuperação ± RSD, %						
Fortificação (ng mL ⁻¹)		SMX	SQX	SMZ	CLF	OTC	TC	CTC
Intr a- dia	200 ^(a)	99 ± 4	96 ± 3	97 ± 8	100 ± 2	97 ± 4	98 ± 6	103 ± 6
	100	108 ± 8	104 ± 4	103 ± 10	109 ± 7	92 ± 14	112 ± 6	103 ± 6
5 dias diferentes ^(b)	200	99 ± 4	110 ± 8	101 ± 7	102 ± 10	100 ± 2	106 ± 7	107 ± 6
	300	104 ± 11	106 ± 7	107 ± 14	101 ± 7	93 ± 5	83 ± 8	100 ± 12

^(a) n=5, ^(b) n=5, RSD: estimativa do desvio padrão relativo.

LIMITE DE DETEÇÃO

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser diferenciado do sinal de fundo (ruído) do instrumento utilizado para a medida. Para análises espectrométricas e cromatográficas, o LOD é determinado pela razão sinal/ruído igual a 2 ou 3. Este valor deve ser confirmado experimentalmente.

A ANVISA sugere apenas que o LOD deve ser estabelecido por meio da análise de amostras de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, recomendando que o LOD seja 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

O menor nível detectável encontrado experimentalmente para todos os analitos em estudo foi de 20 ng mL⁻¹. Para as substâncias que tem LMR definido, e no caso dos antimicrobianos em estudo onde o LMR é de 100 ng mL⁻¹, exceto para o CLF, o LOD é adequado para o objetivo a que se propõe. No caso do CLF que tem um LMPR (limite máximo de performance requerida) de 0,3 ng mL⁻¹ (EC, 2002), o método desenvolvido não apresenta detectabilidade adequada. Para se conseguir

chegar a esse nível de concentração, teria que se concentrar o analito no preparo de amostra por uma ordem de magnitude. Isso não seria viável com o procedimento proposto. Cabe destacar que apenas os métodos de cromatografia líquida associado ao espectrômetro de massa em tandem permitem a identificação e determinação neste nível de concentração.

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LOQ) é definido como o nível mínimo que o analito pode ser medido com exatidão e precisão. Em alimentos, é considerado com o nível de concentração determinado por um sinal que exceda dez vezes a estimativa do desvio padrão relativo do ruído da amostra do branco. Esse valor deve ser confirmado experimentalmente.

A ANVISA recomenda que o LOQ também pode ser obtido por meio da análise de amostras branco adicionadas de concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Propõe, ainda, para o estabelecimento do LOQ o emprego da razão de 5:1 para o sinal e ruído da linha de base. É importante ressaltar para que o método seja aceitável para a determinação de contaminantes em alimentos, o LOQ deve ser menor do que o LMR ou LMPR estabelecido para o analito em questão.

A concentração de 60 ng mL⁻¹, avaliada experimentalmente para todos os analitos, exceto CLF, confirmam o LOQ adequado para a determinação de resíduos de antimicrobianos em matriz leite, considerando também que este valor se encontra abaixo do LMR (100 ng mL⁻¹).

IV.4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO

O leite pasteurizado é aquele submetido a altas temperaturas, a qual visa a destruição da flora microbiana causadora de doenças, sem tirar as características próprias do produto.

Existem três tipos de leite: leite tipo A, tipo B e tipo C, de acordo com sua qualidade.

O leite tipo A é obtido através da ordenha mecânica e é pasteurizado em indústria que fica na própria fazenda ou sítio, sendo mantido à 10 °C até o momento da pasteurização, que deve ser realizada imediatamente. O leite A deve ser avaliado para os teores de resíduos de antimicrobianos, cujo limite legalmente permitido é de 0,05 UI mL⁻¹. Quanto ao número máximo de microrganismos se aceita 2000 mL⁻¹ de leite e ausência de coliformes totais (SENA, 2006).

O leite tipo B é produzido em sistema de ordenha preferencialmente mecânica, devendo ser transportado e resfriado à 10 °C, em um período de até 6 horas após a ordenha. O número máximo de microrganismos permitido é de 80.000 mL⁻¹ e coliformes totais e coliformes fecais de 4 mL⁻¹ e 1 mL⁻¹, respectivamente.

O leite tipo C é produzido por meio de ordenha manual sem resfriamento obrigatório. O número máximo total de bactérias é de 300.000 mL⁻¹, coliformes até 4 mL⁻¹ e fecais 2 mL⁻¹ (SENA, 2006).

O leite pasteurizado pelo tratamento que recebe, é um tipo de leite que precisa ter maior cuidado no que diz respeito a sua conservação, em comparação ao leite de tipo UHT, que é esterilizado.

A contaminação do leite por antimicrobianos pode ser decorrente da administração destes nas vacas leiteiras para fins terapêuticos, no qual não foi respeitado o período de carências, ou até mesmo pela adição intencional de antimicrobianos ao leite com a finalidade de prolongar a vida útil do produto.

Para avaliar a presença de antimicrobianos no leite foram analisados três tipos de leite pasteurizado, tipo A, tipo B e tipo C de diferentes marcas comerciais (ver Tabela IV.12) vendidos nos supermercados da cidade de Campinas, SP, em julho de 2006.

Tabela IV.12 Amostras de leite tipos A, B e C coletadas no comércio de Campinas.

Tipos de leite	Nº de fabricantes	Nº de lotes	Total de amostras
A	2	2	4
B	2	2	4
C	2	2	4

A Tabela IV.13 apresenta os resultados das análises de leite quanto à presença de multiresíduos de antimicrobianos.

Foi verificado que, nas amostras analisadas, todos os antimicrobianos estavam abaixo do limite de detecção do método (20 ng mL^{-1}) e abaixo do limite máximo de resíduo permitido pela legislação vigente (EC, 2002).

Cabe destacar que o objetivo do trabalho não foi de realizar um controle de qualidade do leite que é comercializado na região, para o qual se precisaria de uma amostragem maior, mas sim aplicar o método desenvolvido e validado para amostras do mercado.

Tabela IV.13 Análise de leite pasteurizado dos tipos A, B e C quanto à presença de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC, CTC e CLF.

Antimicrobianos	Teor médio (ng mL^{-1}) em amostras de leite pasteurizado de diferentes marcas, (n=4)		
	Tipo A	Tipo B	Tipo C
SMX	nd	nd	nd
SQX	nd	nd	nd
SMZ	nd	nd	nd
OTC	nd	nd	nd
TC	nd	nd	nd
CTC	nd	nd	nd
CLF	nd	nd	nd

nd = não detectado, aplicando o LOD de 20 ng mL^{-1} , LMR = 100 ng mL^{-1}

IV.5 CONCLUSÕES

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência é o preparo de amostra, particularmente a etapa de extração em fase sólida, principalmente quando se está trabalhando com

compostos de propriedades físico-químicas distintas, matrizes complexas e concentrações na ordem de ng mL^{-1} .

A cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detetor por arranjo de fotodiodos é adequada para a determinação simultânea de resíduos de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC e CTC em leite. Considerando os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAA) para os antimicrobianos em estudo ($\text{LMR } 100 \text{ ng L}^{-1}$). Os LOQ e demais parâmetros de validação do método cromatográfico desenvolvido são adequados para o monitoramento de resíduos de SQX, SMX, SMZ, TC, CTC e OTC em leite.

Para o CLF, que tem um LMPR de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$, o método proposto não tem detectabilidade adequada para o controle de qualidade do leite, tendo em vista que o limite de detecção foi 20 ng mL^{-1} . Para esse nível de concentração sugere-se o emprego da cromatografia líquida associada a espectrometria de massas.

Foi verificado que as amostras de leite pasteurizadas tipo A, B e C analisadas não apresentaram resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina e sulfametoxazol em leite acima dos LMR estabelecidos pela MAA, o que indica que as boas práticas veterinárias estejam sendo respeitadas.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho de tese levou às seguintes conclusões finais:

Eletroforese Capilar

O cálculo das mobilidades eletroforéticas efetivas, quando as mobilidades eletroforéticas das espécies e os valores de pKa são conhecidas, permite estabelecer a faixa de pH para separação dos analitos, reduzindo o trabalho experimental na etapa de desenvolvimento do método.

O planejamento experimental é uma ferramenta atrativa para a otimização das condições eletroforéticas, principalmente quando se pretende avaliar a separação de um grande número de compostos.

A robustez dos métodos eletroforéticos propostos é um parâmetro crítico e deve ser avaliado de forma rigorosa para garantir a confiabilidade dos dados gerados.

A eletroforese capilar de zona, com detetor por arranjo de fotodiodos é adequada para a determinação de OTC, TC, CTC, DXC, SMZ, SMX, SQX, CIPRO, ENRO, DANO e CLF em formulações farmacêuticas, tais como comprimidos, soluções orais e oftálmicas e formulações injetáveis. Em comparação a cromatografia líquida de alta eficiência, a eletroforese capilar é mais simples, de menor custo operacional e apresenta uma maior abrangência, ou seja, o mesmo método pode ser empregado para diferentes antimicrobianos, mesmo sendo de famílias diferentes.

A eletroforese capilar atende todos os critérios de aceitação quanto aos parâmetros de validação preconizados pela ANVISA para ser empregado no controle de qualidade de fármacos em substituição e/ou complementação à cromatografia líquida de alta eficiência. Nesse sentido, seria interessante que métodos eletroforéticos fossem desenvolvidos e incluídos como monografias nas farmacopéias.

A eletroforese capilar não apresentou vantagens frente a HPLC na determinação de multiresíduos de antimicrobianos em leite, uma vez que a

detectabilidade da técnica exige procedimentos elaborados de preparo de amostra para concentração dos analitos e eliminação de interferentes.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência com detetor por arranjo de fotodiodos é adequada para a separação simultânea de resíduos de SMX, SQX, SMZ, OTC, TC e CTC em leite. Considerando os limites máximos de resíduos estabelecidos pelo Codex Alimentarius e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil para os antimicrobianos em estudo (100 ng mL^{-1}), os limites de quantificação e demais parâmetros de validação, o método cromatográfico desenvolvido é adequado para o monitoramento de resíduos de SQX, SMX, SMZ, TC, CTC e OTC em leite.

No caso do CLF, que é proibido para animais produtores de alimentos, através do método proposto não se conseguiu alcançar os limites mínimos de performance requerida ($0,3 \text{ ng mL}^{-1}$). Para detectar esses níveis de concentração recomenda-se o emprego da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas.

Um dos pontos críticos do método de análise de multiresíduos de antimicrobianos em leite é o preparo de amostra, particularmente na etapa de extração em fase sólida na qual se realiza a concentração dos analitos e eliminação dos interferentes. Como os analitos das diferentes famílias de antimicrobianos apresentam propriedades físico-químicas distintas é difícil otimizar um procedimento único para separar todos os analitos da matriz leite com eficiência de extração adequada.

A extração líquido-líquido a baixa temperatura, embora seja um método simples de preparo de amostra, não apresentou vantagens frente à extração em fase sólida no que se refere a eficiência de extração dos antimicrobianos do leite e eliminação de interferentes.

Cabe destacar que é importante avaliar a estabilidade dos analitos na amostra após coleta e estocagem, para estabelecer as condições adequadas e garantir a integridade do analito na amostra na etapa de quantificação. Muitos trabalhos na literatura não apresentam esses estudos. No nosso trabalho foi verificado que, por exemplo, a OTC não é estável no leite quando a amostra é congelada a -18°C .

Foi verificado que as amostras analisadas de leite tipo A, B e C não apresentaram resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfametazina, sulfaquinoxalina e sulfametoxazol acima dos LMR estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil em leite, indicando que as boas práticas veterinárias têm sido respeitadas para as amostras analisadas.

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABETE, M.C., GENTA, E., SQUADRONE, S. Tetraciclina nel latte: Determinazione mediante HPLC/DAD. *Industrie Alimentari*, v. 360, p. 753-755, 1997.

Acessado em 06/02/2007.

AGARWAL, V.A. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 13, p. 3531-3539, 1990.

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

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, p. 145-150, 2005.

ANDERSON, R. *Sample pretreatment and separation*. Analytical Chemistry by Open Learning. John Wiley, Chichester, 632, 1991.

ANG, C.Y.W., LUO, W., CALL, V.L., RIGHTER, H.F. Comparison of liquid chromatography with microbial inhibition assay for determination of incurred amoxicillin and ampicillin residues in milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 45, p. 4351-4356, 1997.

ANVISA, Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. RE nº 899, de 29/05/2003.

BARRÓN, D., JIMÉNEZ-LOZANO, BARBOSA, J. Prediction of electrophoretic behaviour of a series of quinolones in aqueous methanol. *Journal of Chromatography A*, v. 919, p. 395-406, 2001.

- BARRY, A.L. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: Theoretical considerations. In: *Antibiotics in laboratory medicine*, 2nd ed.; edited by V. Lorian, Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.
- BAYO, J., MORENO, M.A., PRIETA, J., DIAZ, D., SUAREZ, G., DOMINGUEZ, L. Chloramphenicol extraction from milk by using the diphasic dialysis method followed by liquid chromatographic determination. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 77, p. 854-856, 1994.
- BOATTO, G., PAU, A., PALOMBA, M., ARENARE, L., CERRI, R. Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 20, p. 321-326, 1999.
- BORGES, G.T., SANTANA, A.P., DE MESQUITA, A.J., MESQUITA, S.Q.P., DA SILVA, L.A.F., NUNES, V.Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v. 1, p. 59-63, 2000.
- BRASDSTETEROVA, E., KUBALEC, P., BOVANOVA, L., SIMKO, P., BEDNARIKOVA., MACHÁCKOVÁ, L. SPE and MSPD as pre-separation techniques for HPLC of tetracycline in meat, milk and cheese. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, v. 205, p. 311-315, 1997.
- CARSON, M.C & BRESLYN, W. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using metal chelate affinity chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 76, p. 329-334, 1993.
- CASTELLANOS, G.E., SCHEPDAEL, V.A., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis: method development and validation. *Journal of Chromatography A*, v. 895, p. 43-49, 2000.
- CHEN, C-L & GU, X. Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum, and urine by capillary electrophoresis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 78, p. 1369-1377, 1995.
- CINQUINA, A.L., LONGO, F., ANASTASI, G., GIANNETTI, L., COZZANI, R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline

- in bovine milk and muscle. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 227-233, 2003a.
- CINQUINA, A.L., LONGO, F., ANASTASI, G., GIANNETTI, L., COZZANI, R. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 227-233, 2003b.
- CROUBELS, S., VAN PETEGHEM, C., BAEYENS, W. Sensitive spectrofluorimetric determination of tetracycline residues in bovine milk. *The Analyst*, v. 119, p. 2713-2716, 1994.
- DAVIDSON, P. M., BRANEN, A. L. *In: Antimicrobials in foods*. 2 ed. Marcel Dekker, New York. 647 p. 1993.
- DENOBILO, M. & NASCIMENTO, S. E. Validation of method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline residues in milk by high-performance liquid chromatography. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 209-218, 2004.
- DONG Y. Capillary electrophoresis in food analysis. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 87-93, 1999.
- EC. European Commission, Regulation 2002/657/EC, 12 August. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Communities*, L 221/8-L221/36. 2002.
- EMBRAPA 1, Embrapa Gado de Leite, fonte: FAO.
<http://www.cnpq.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela0211.php>
Acessado em 05/11/2005.
- EMBRAPA 2, Embrapa Gado de Leite, fonte: FAO.
<http://www.cnpq.embrapa.br/producao/dados2002/producao/tabela0212.php>
Acessado em 05/11/2005.
- EMBRAPA 3, Zoccal, R. Embrapa Gado de Leite. Portal do agronegócio.
<http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=671>
Acessado em 06/02/2007.

- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations, Codex Alimentarius: Veterinary drug residues in food, 2 September 1999. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=FoodQuality>. Acessado em 03/2003.
- FAO Food and Agriculture Organization of The United Nations. Residuos de antibióticos en productos de acuicultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2002. <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300so6ahtm>. Acessado em 02/2007.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, May, 2001.
- FDA. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Tolerance for residues of new animal drug in food. Code of Federal Regulations. *Food and Drug*, 2002. <http://dil.vetmed.vt.edu>. Acessado em 03/2003.
- FLETOURIS, D., PSOMAS, J. E., BOTSOGLOU, N. A. Trace analysis of oxytetracycline and tetracycline in milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1913-1917.
- FURUSAWA, N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. *Talanta*, v. 59, p. 155-159, 2003a.
- FURUSAWA, N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimicline in milk without organic solvents. *Chromatographia*, v. 57, p. 317-320, 2003b.
- FURUSAWA, N. Rapid liquid chromatographic determination of oxytetracycline in milk. *Journal of Chromatography A*, v. 839, p. 247-251, 1999a.
- FURUSAWA, N. Liquid-chromatographic determination of sulfadimidine in milk and eggs. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 364, p. 270-272, 1999b.
- FURUSAWA, N. Simplified determining procedure for routine monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in milk. *Journal of Chromatography A*, v. 898, p. 185-191, 2000.

- GOMEZ, M.R., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., SILVA, M.F. Simultaneous determination of chloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms. *Talanta*, v. 61, p. 233-238, 2003.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*, oitava edição, Rio de Janeiro, editora Guanabara Koogan, p. 1061-1070, 1990.
- HARIK-KHAN, R. & MOATS, W.A. Identification and measurement of β -lactam antibiotic residues in milk: integration of screening kits with liquid chromatography. *Food Biological Contaminants*, v. 78, p. 978-986, 1995.
- HERNANDEZ, M., AGUILAR, C., BORULL, F., CALULL, M. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 772, p. 163-172, 2002.
- HERNANDEZ, M., BORRULL, F., CALULL, M. Determination of amoxicillin in plasma samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 731, p. 309-315, 1999.
- HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. Rapid assay for monitoring residues of enrofloxacin in milk and meat tissues by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 17, p. 3775-3782, 1994.
- HORSTKOTTER, C., JIMENES-LOZANO, E., BARRON, D., BLASCHKE, G. Determination of residues of enrofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, v. 23, p. 3078-3083, 2002.
- HOUGLUM, J.E., LARSON, R.D., Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 80, p. 961-965, 1997.
- INMETRO, <http://www.inmetro.gov.br>, acessada em 29 de janeiro de 2007.
- KANG'ETHE, E.K., ABOGE, G.O., ARIMI, S.M., KANJA, L.W., OMORE, A.O., McDERMOTT, J.J. Investigation of the risk of consuming marketed milk with antimicrobial residues in Kenya. *Food Control*, v. 16, p. 349-355, 2005.

- KENNEDY, D.G., McCRACKEN, R.J., CANNAVAN, A., HEWITT, S.A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 77-98, 1998.
- KIJAK, P.J. Confirmation of chloramphenicol residues in bovine milk by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 77, p. 34, 1994.
- KIM, D., CHOI, J.O, KIM, J., LEE, D.W. Application of a polymeric solid phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by LC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 26, p. 1149-1159, 2003.
- LANGONI, H., DE ARAÚJO, W.N., DA SILVA, A.V., DE SOUZA, L.C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 67, p. 177-180, 2000.
- LENTZA-RIZOS, CH., AVRAMIDES, E. J., CHERASCO, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Journal of Chromatography A*, v. 912, p. 135-142, 2001.
- LENTZA-RIZOS, CH., AVRAMIDES, E. J., VISI, E. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 912, p. 135-142, 2001.
- LIN, C., LIN, W., CHEN, Y., WANG, S. Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 792, p. 37-47, 1997a.
- LIN, C., CHANG, C., LIN, W. Migration behavior of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A*, v. 768, p. 105-112, 1997b.
- LIN, C., DENG, Y., LIAO, W., SUN, S., LIN, W., CHEN, C. Electrophoretic behavior and pK_a determination of quinolones with a piperaziny substituent by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1051, p. 283-290, 2004.
- LOCK, C.M., CHEN, L., VOLMER, D.A. Rapid analysis of tetracycline antibiotics by combined solid phase microextraction/high performance liquid

- chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, v. 13, p. 1744-1754, 1999.
- LONG, A.R., HSIEH, L.C., BELLO A.C., MALBROUGH, M.S., SHORT, C.R., BARKER, S.A. Method for the isolation and liquid chromatography determination of chloramphenicol in milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 38, p. 427-429, 1999.
- LONG, A.R., HSIEH, L.C., MALBROUGH, M.S., SHORT, C.R. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. v. 73, p. 379-384, 1990a.
- LONG, A.R., SHORT, C.R., BARKER, S.A. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk. *Journal of Chromatography*, v. 502, p. 87-94, 1990b.
- LUNN G., SCHMUFF, N. HPLC methods for pharmaceutical analysis. New York, John Wiley & Sons, 1997.
- MAA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DIPOA, Programa de Controle de Resíduos em Leite – PCRL – Instrução Normativa No. 42, de 20 de Dezembro de 1999, pp. 43, 2000.
- http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/imagens/in_42_99.pdf. Acessado em 03/2003.
- MARZUELA, M.D., MORENO-BONDI, M.C., Multiresidues determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*. v. 1034, p. 25-32, 2004.
- MEETSCHEN, U., PETZ, M. Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. v. 7, p. 373-378, 1990.
- MOATS, A.W & ROMANOWSKI, R.D. Multiresidue determination of β -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *Journal of Chromatography A*, v. 12, p. 237-247, 1998.

- MOATS, W. A. & HARIK-KAHN, R. Rapid HPLC determination of tetracyclines antibiotics in milk. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 43, p. 931-934, 1995.
- MORIGUCHI, I., HIRON, S., NAKAGOME, I., HIRANO, H. Comparison of reliability of $\log P$ values for drugs calculated by several methods. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 42, p. 976-978, 1994.
- NIELSEN, S.S., *Food Analysis*, second ed., New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- O'KEEFFE, M., KENNEDY, O. Residues – A food safety problem? *Journal of Food Safety*, v. 18, p. 297-319, 1998.
- OKA, H., IKAI, Y., HAYAKAMA, J. Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part XIX: Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatographic/fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 77, p. 891-895, 1994.
- OKA, H., ITO, Y., MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 882, p. 109-133, 2000.
- PALERMO NETO, J. O. Uso adequado de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal: aspectos de farmacocinética e de toxicologia; possíveis impactos na qualidade da proteína de origem animal. In: Seminário – O uso adequado de antimicrobianos como aditivos melhoradores da eficiência alimentar em animais de produção. SINDAN. São Paulo-SP, p. 20-36, 1999.
- PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- PEREZ, N., GUITERREZ, R., NOA, M., DIAZ, G., LUNA, H., ESCOBAR, I., MUNIVE, Z. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 85, p. 20-24, 2002.
- PFENNING, M.R., MADSON, J.E., TURNIPSEED, S.B., GONZALES, S.A.; HURLBURT, J.A.; SALMON, G.D. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol residues in milk by gas

- chromatography with electron capture detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 81, p. 714-720, 1998.
- PODHORNIAK, L.V., LEAKE, K., SCHENCK, F.J. Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *Journal of Food Protection*, v. 62, p. 547-548, 1999.
- POSYNIK, A., ZMUDZKI, J., SMENIUK, S., NIEDZIELSKA, J., ELLIS, R. Determination of fluoroquinolones residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, v. 13, p. 279-285, 1999.
- QUÍMICA NOVA ESCOLA. Experiências Lácteas. n.º 06, Novembro, 1997.
<http://www.lapemm.ufba.br/leite.htm>. Acessado em 04/2007.
- ROYBAL, J. E., PFENNING, A. P., TURNIPSEED, S. B., WALKER, C.C., HURLBUT, J.A. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *Drugs, Cosmetics, Forensic Science*, v. 80, p. 982-987, 1997.
- SANTOS, M. R., TAVARES, M. F. M., RUBIM, J. C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. *Química Nova*, v. 23, p. 585-589, 2000.
- SANTOS, S. M., HENRIQUES, M., DUARTE, A. C., ESTEVES, V. I. Development and application of capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta*, v. 71, p. 731-737, 2007.
- SCHENCK, F. J., CALLERY, P. S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, 812, p. 99-109, 1998.
- SCHMITT-KOPPLIN, P.H., BURHENNE, J., FREITAG, D., SPITELLER, M., KETTRUP, A. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and applications to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *Journal of Chromatography A*, v. 837, p. 253-265, 1999.
- SENA, O. M. C., Como diferenciar os diversos tipos de leite. Portal da Cidadania. *Ciencia & Tecnologia*, 2006.
<http://www.radiobras.gov.br/ct/materia.phtml?tipo=AR&materia=161974>,
Acessado em 08/08/06.

- SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A.*, v. 987, p. 57-66, 2003.
- SILVA, J. A. F., TAVARES, M. F. M., COLTRO, W. K. T., CARRILHO, E. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, 2007 (*in press*).
- SMEDLEY, M.D., WEBER, J.D. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 73, p. 875-879, 1990.
- SORENSE, L.K., RASMUSSEN, B.M., BOISON, J.O., KENG, L. Simultaneous determination of six penicillins in cows raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography B.*, v. 694, p. 383-391, 1997.
- SORENSE, L.K., SNOR, L.K. Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 882, p. 145-151, 2000.
- TAKEBA, K., FUJINUMA, K., MIYAZAKI, T., NAKAZAWA, H. Simultaneous determination of β -lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 205-211, 1998.
- TAVARES, M.F.M. & MCGUFFIN, V.L. Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.*, v. 686, p. 129-142, 1994.
- THOMAS, M., Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, p. 564-567, 1989.
- TYCZKOWSKA, K.L., VOYKSNER, R.D., ANDERSON, K.L., PAPICH, M.G. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography.

- Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, v. 658, p. 341-348, 1994.
- USP XXVIII, THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. The National Formulary, 28th ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2005.
- VAN POUCKE, L.S.G., DEPOURCQ, G.C.I., VAN PETEGHEM, C.H. A quantitative method for the detection of sulfonamide residues in meat and milk samples with a high-performance thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatographic Science*, v. 29, p. 423-427, 1991.
- VAN RHIJN, J.A., LASAROMS, J.J.P., BERENDSEN, B.J.A., BRINKMAN, U.A.Th. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk. *Journal of Chromatography A.*, v. 960, p. 121-133, 2002.
- VIÑAS, P., LÓPEZ, E.C., CAMPILLO, M., HERNÁNDEZ, C.M. Determination of sulphonamides in foods by liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A.* v. 726, p. 125-131, 1996.
- ZHAO, F., ZHANG, X., GAN, Y. Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *Journal of Chromatography A.*, v. 1055, p. 109-114, 2004.
- WESTON, A., BROWN, P. HPLC and CE, Principles and Practice, Academic Press, California, 1997.

ANEXOS

ESTUDO DE ESTABILIDADE

1. TETRACICLINAS

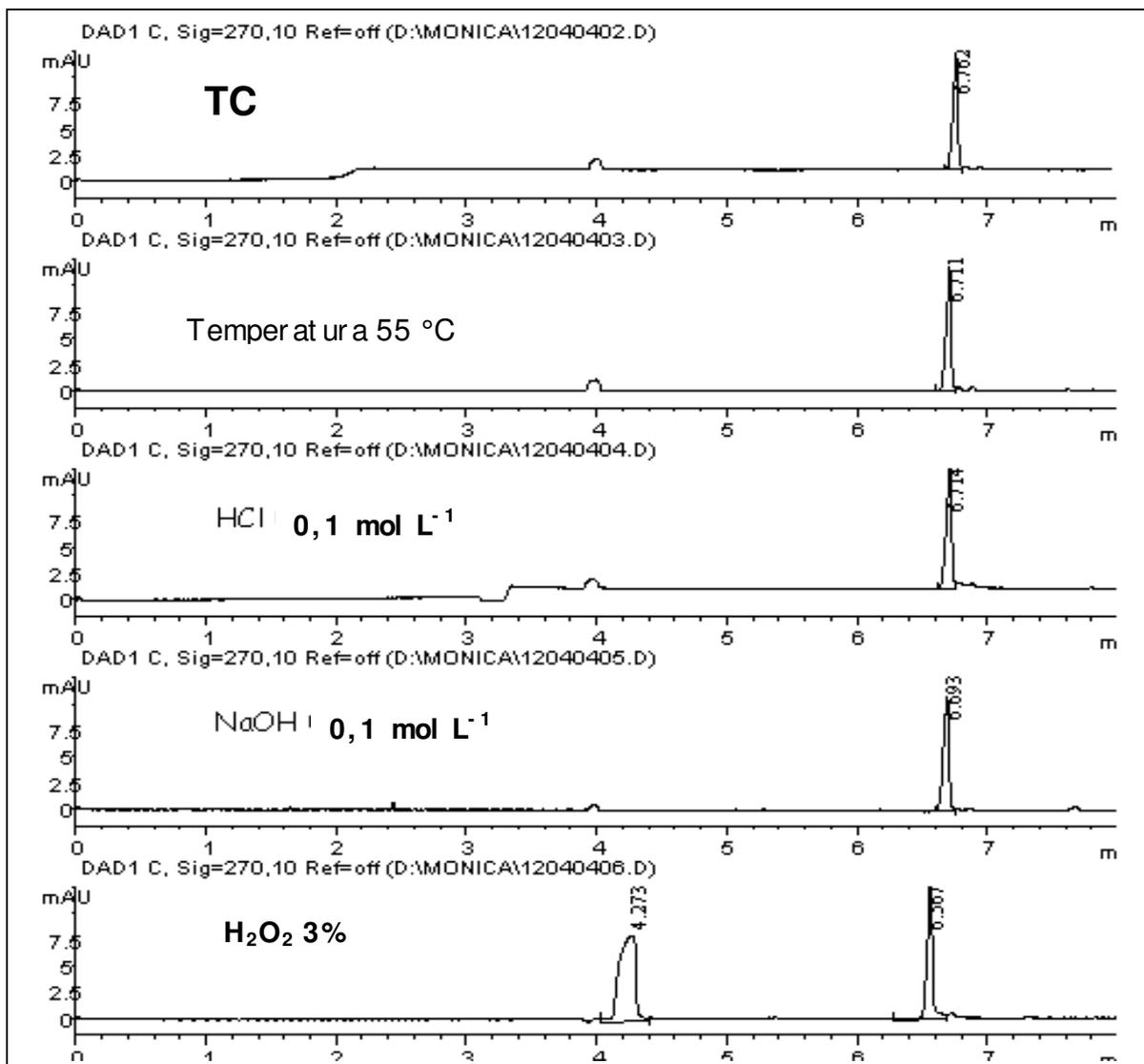


Figura I Estudo de estabilidade de TC 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse, 55 °C, HCL 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, voltagem 13 kV, λ 270 nm.

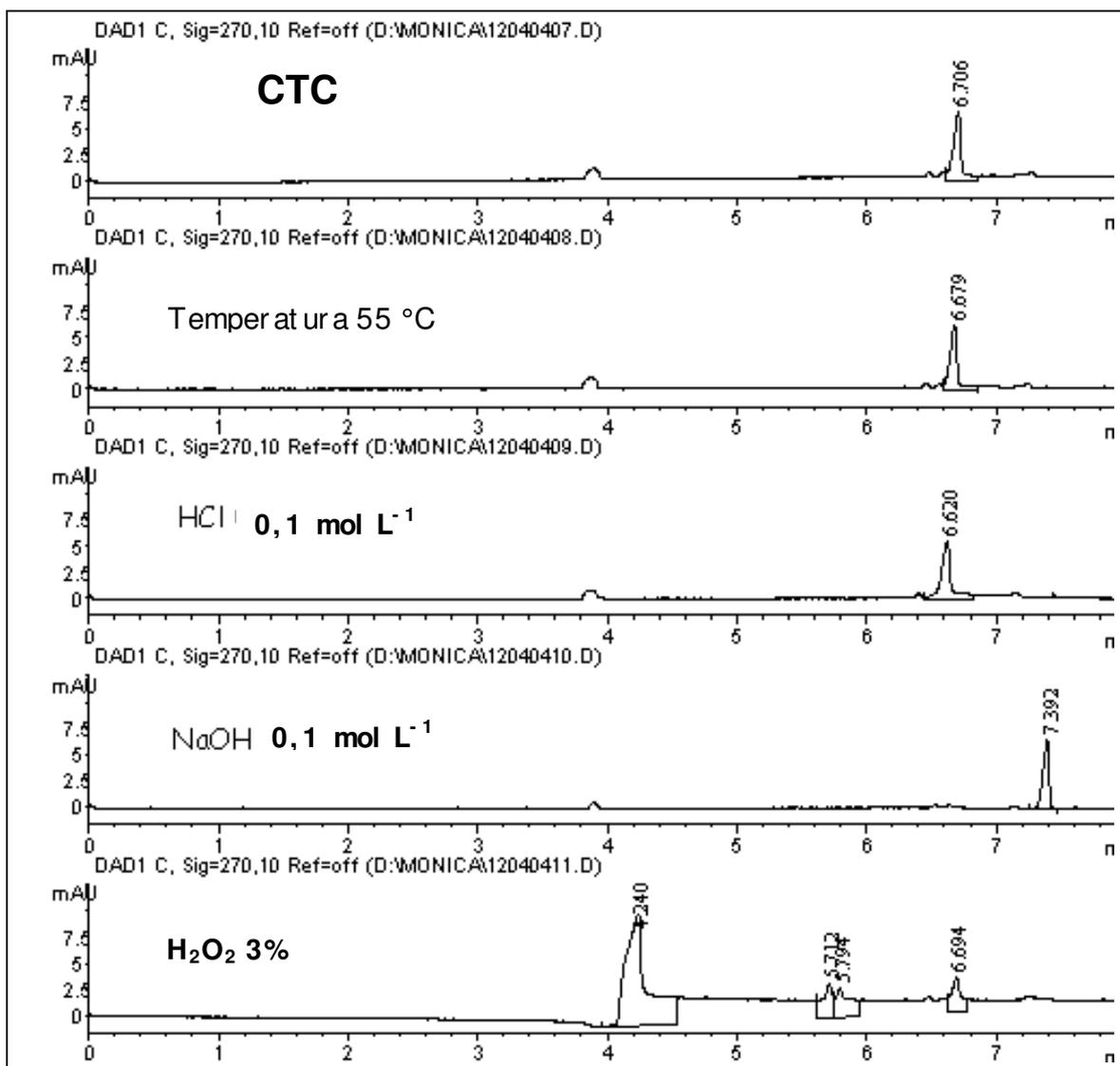


Figura 2. Estudo de estabilidade de CTC 50 µg mL⁻¹, por eletroforese capilar. Condições de estresse, 55 °C, HCL 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, voltagem 13 kV, λ 270 nm.

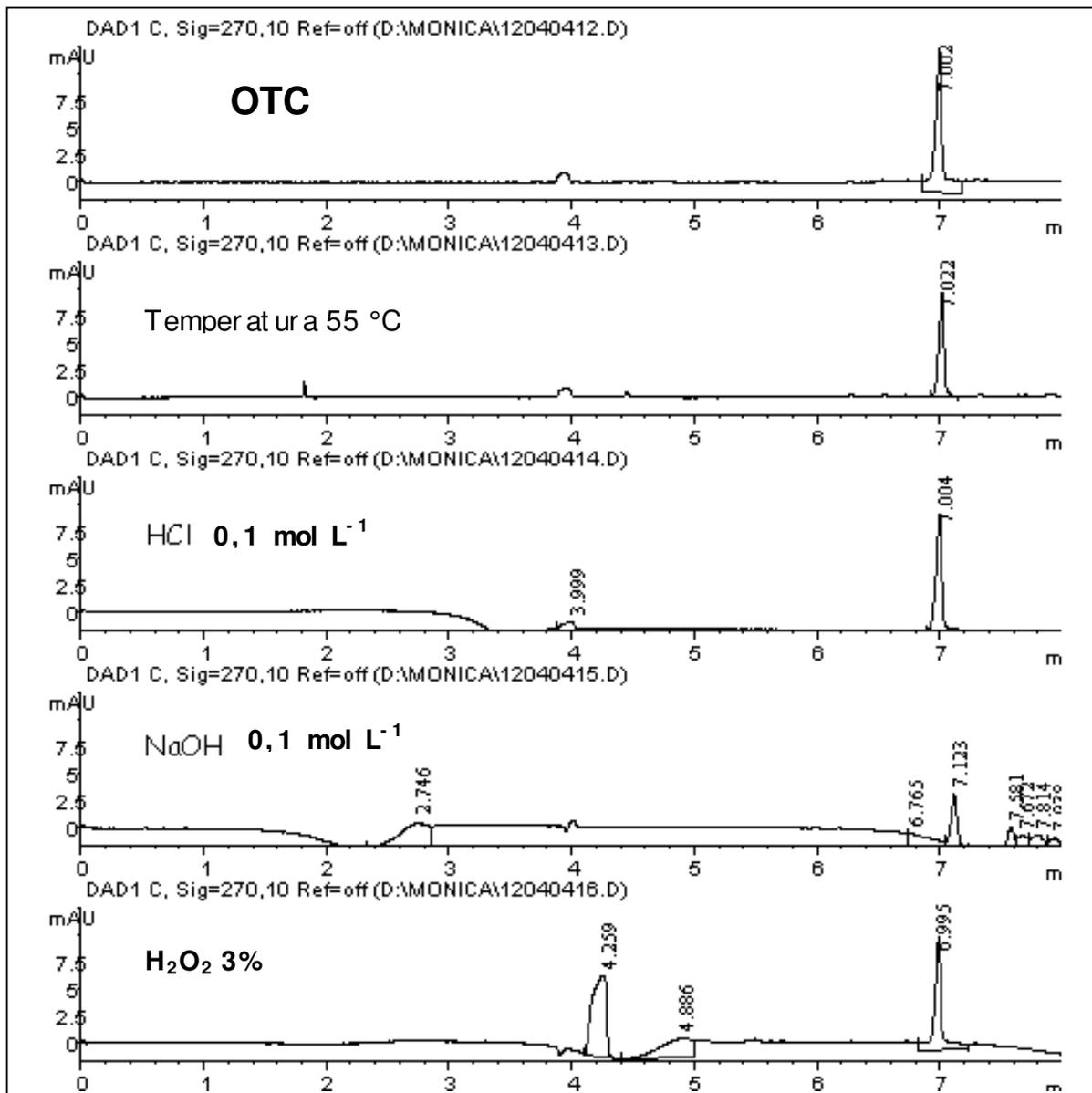


Figura 3. Estudo de estabilidade de OTC 50 µg mL⁻¹, por eletroforese capilar. Condições de estresse, 55 °C, HCL 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, voltagem 13 kV, λ 270 nm.

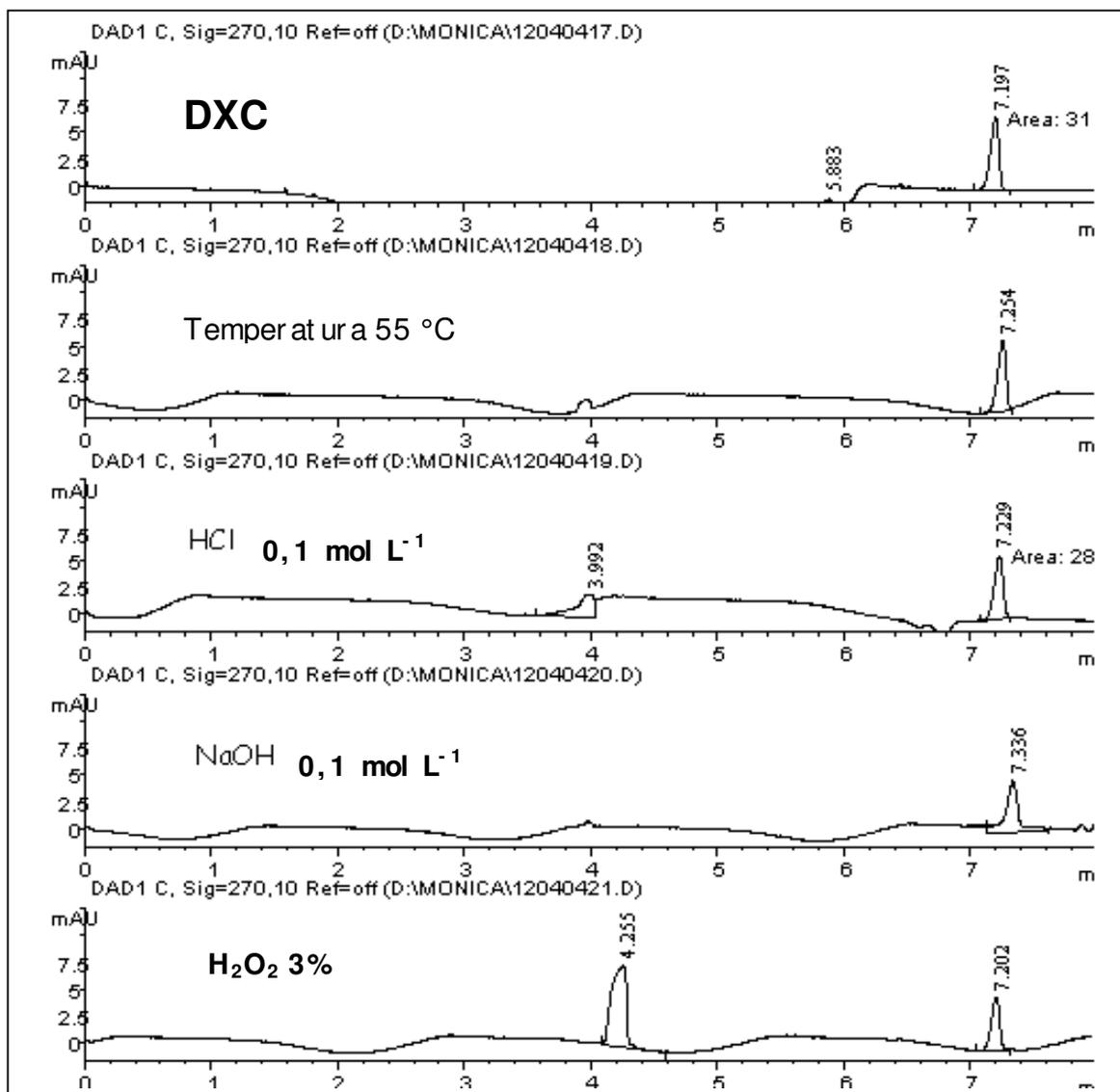


Figura 4. Estudo de estabilidade de DXC 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito carbonato de sódio 50 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 10, temperatura 23 °C, voltagem 13 kV, λ 270 nm.

2. CLORANFENICOL

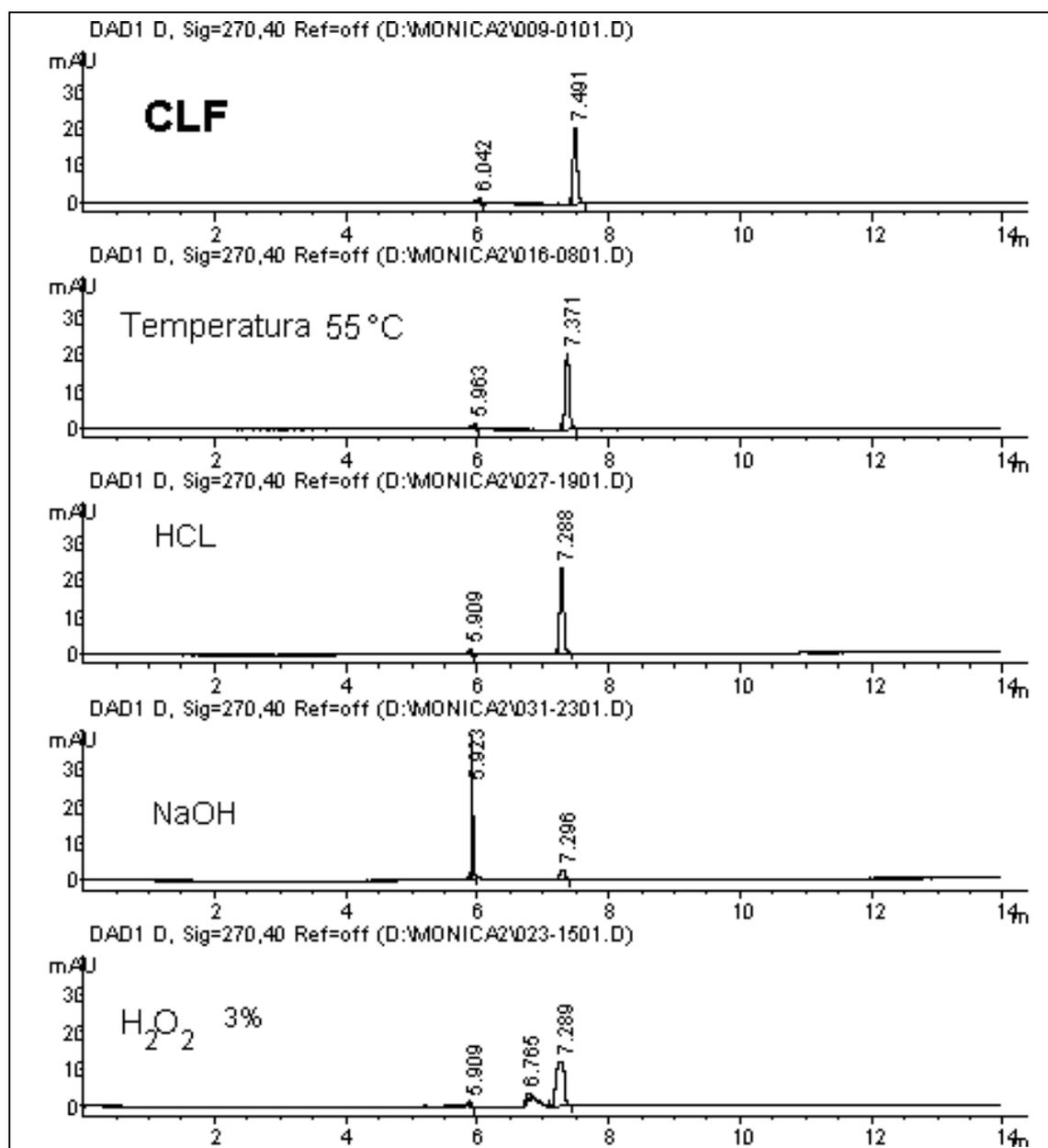


Figura 5. Estudo de estabilidade de CLF $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse $55 \text{ }^\circ\text{C}$, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L^{-1} / borato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura $26 \text{ }^\circ\text{C}$, voltagem 24 kV e λ 203

3. FLUOROQUINOLONAS

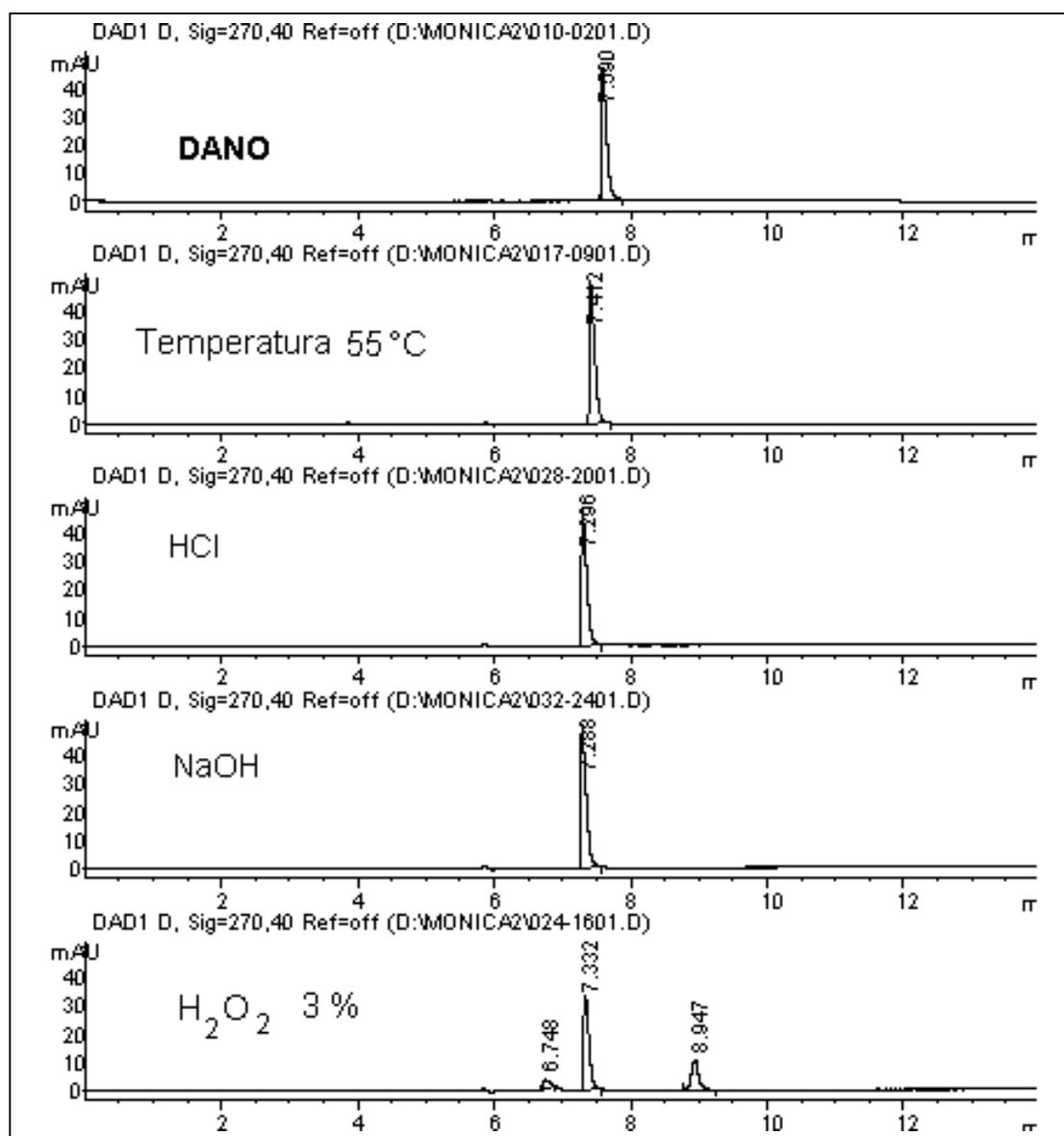


Figura 6. Estudo de estabilidade de DANO $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse $55 \text{ }^\circ\text{C}$, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L^{-1} / borato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura $26 \text{ }^\circ\text{C}$, voltagem 24 kV e λ 270

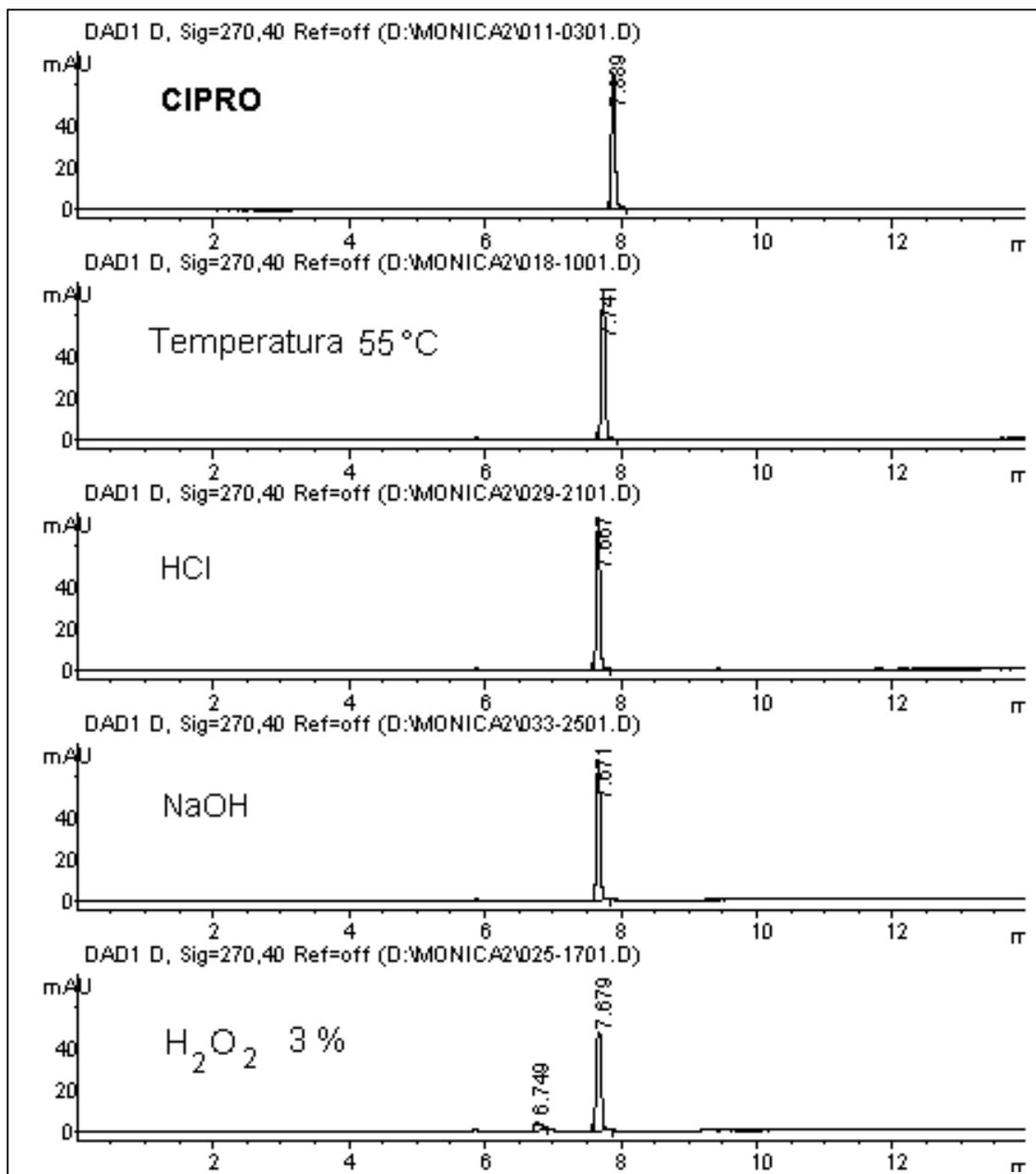


Figura 7. Estudo de estabilidade de CIPRO 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L^{-1} , NaOH 0,1 mol L^{-1} e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L^{-1} / borato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura 26°C, voltagem 24 kV e λ 270 nm.

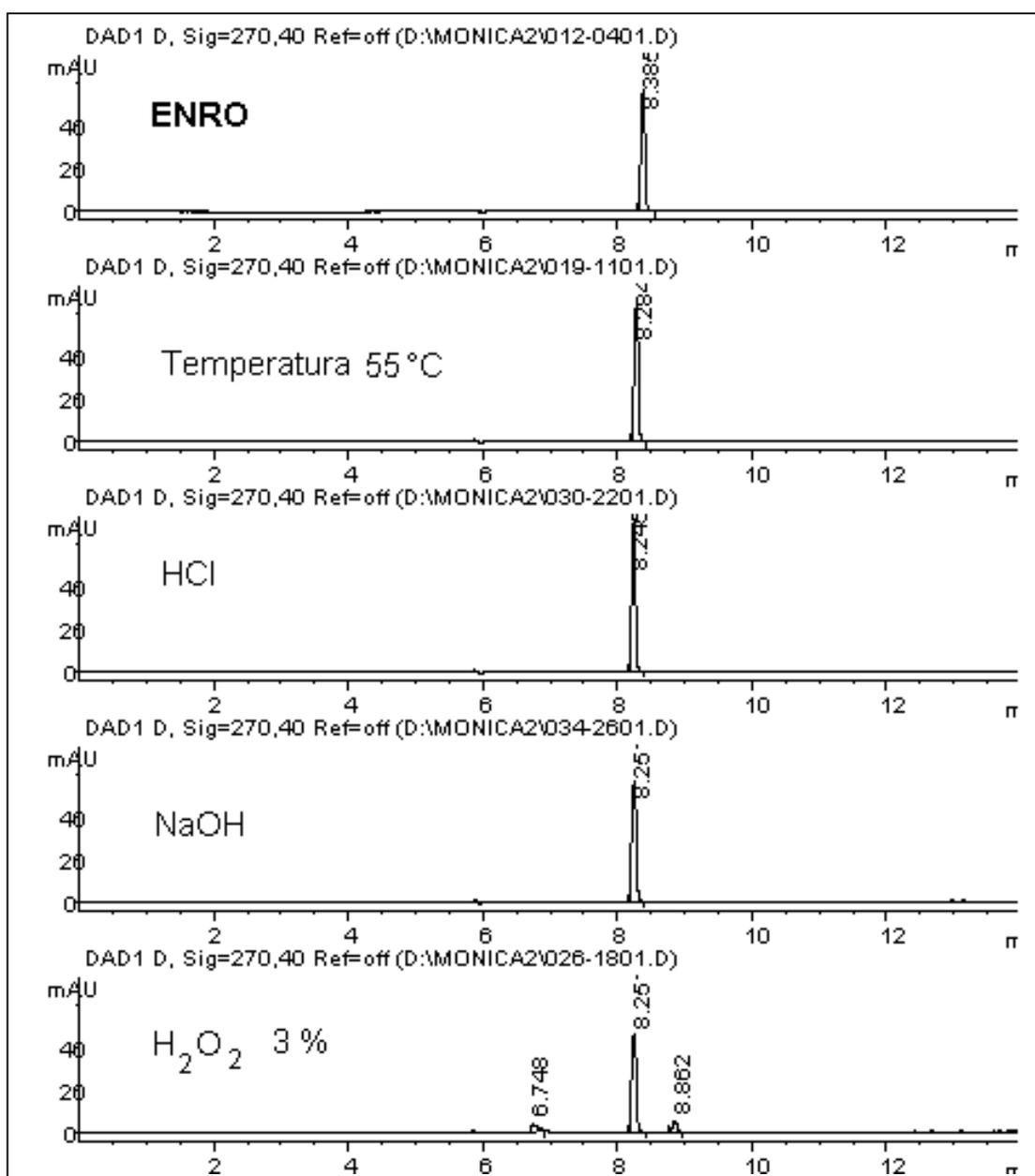


Figura 8. Estudo de estabilidade de ENRO 50 µg mL⁻¹, por eletroforese capilar. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L⁻¹ / borato 20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, temperatura 26°C, voltagem 24 kV e λ 270 fluoroquinolonas

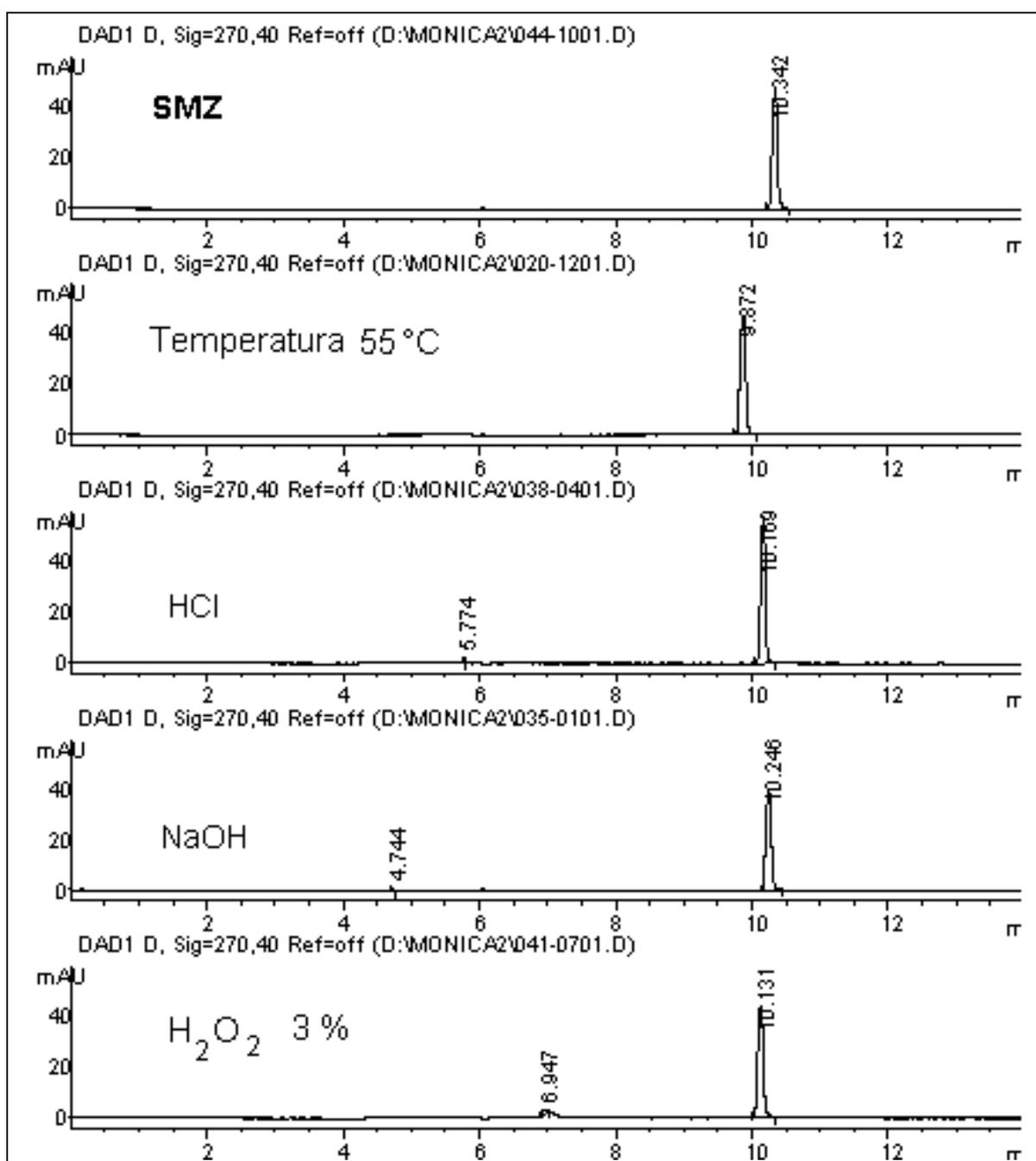


Figura 9. Estudo de estabilidade de SMZ $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse $55 \text{ }^\circ\text{C}$, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L^{-1} / borato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura $26 \text{ }^\circ\text{C}$, voltagem 24 kV e λ 203 sulfonamidas.

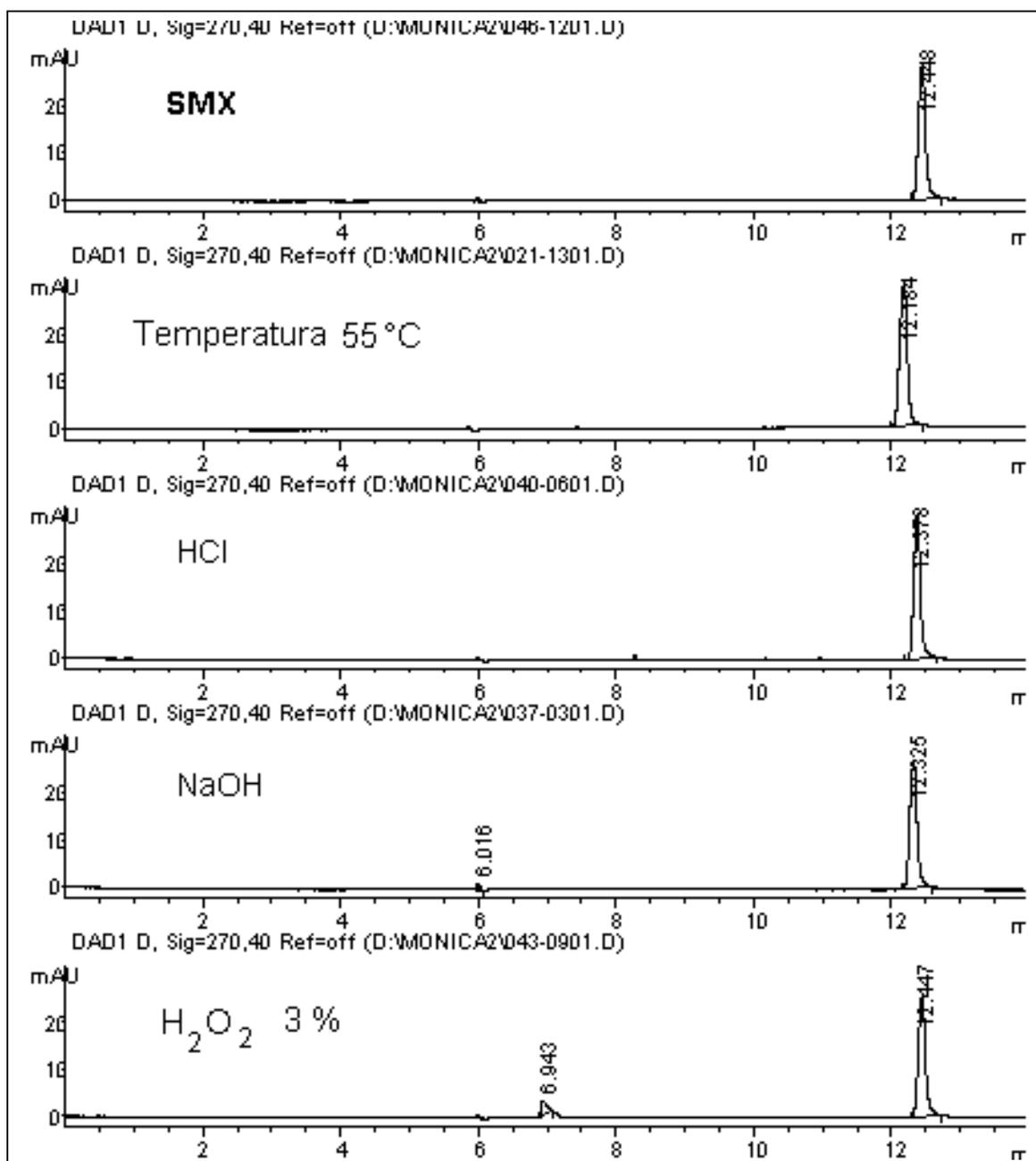


Figura 10. Estudo de estabilidade de SMX 50 µg mL⁻¹, por eletroforese capilar. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L⁻¹ / borato 20 mmol L⁻¹ + EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8,5, temperatura 26°C, voltagem 24 kV e λ 203 sulfonamidas.

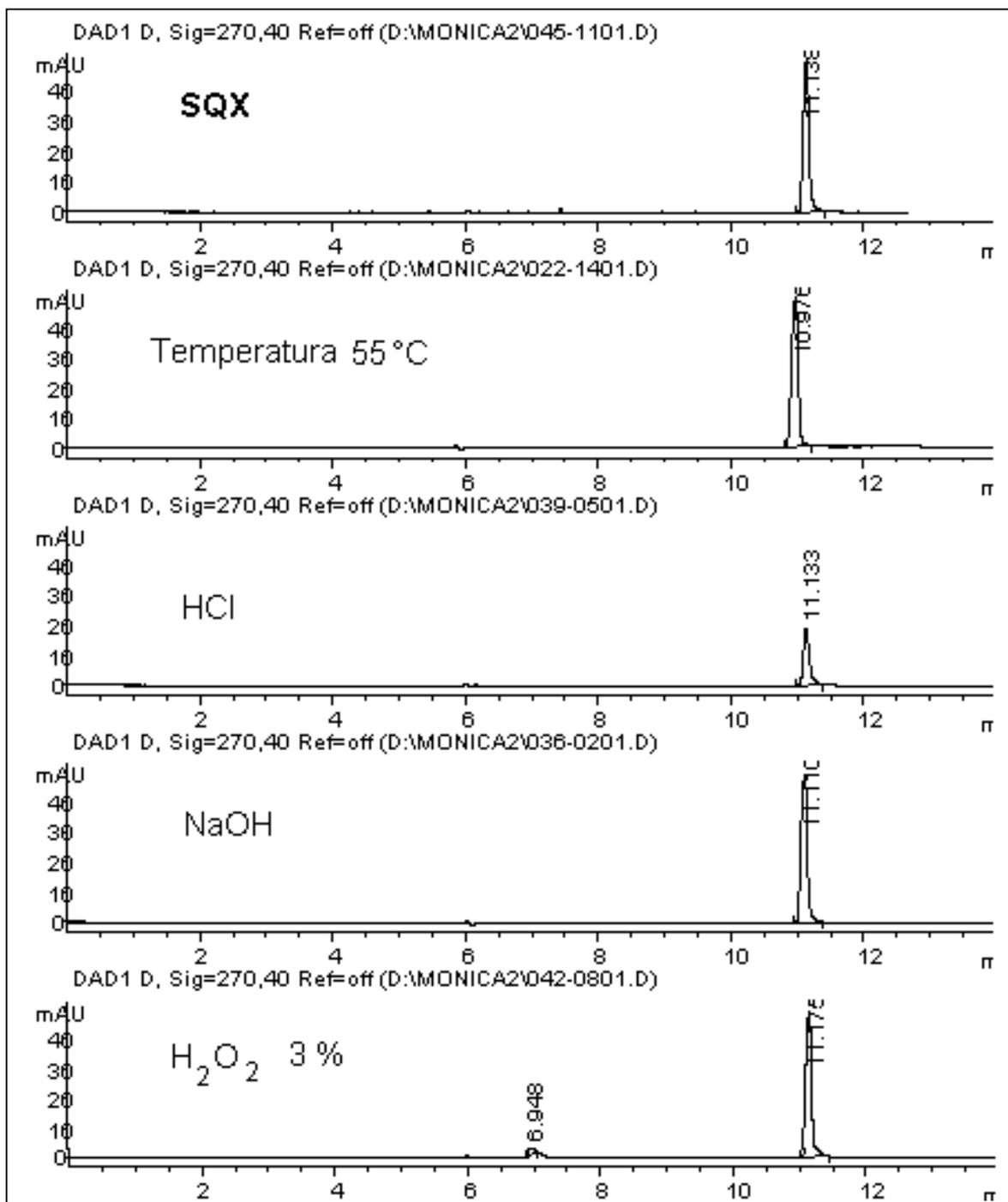


Figura 11. Estudo de estabilidade de SQX $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, por eletroforese capilar. Condições de estresse $55 \text{ }^\circ\text{C}$, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 3%. Condições de análise: eletrólito fosfato 60 mmol L^{-1} / borato 20 mmol L^{-1} + EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8,5, temperatura 26°C , voltagem 24 kV e λ 203 sulfonamidas.

HPLC

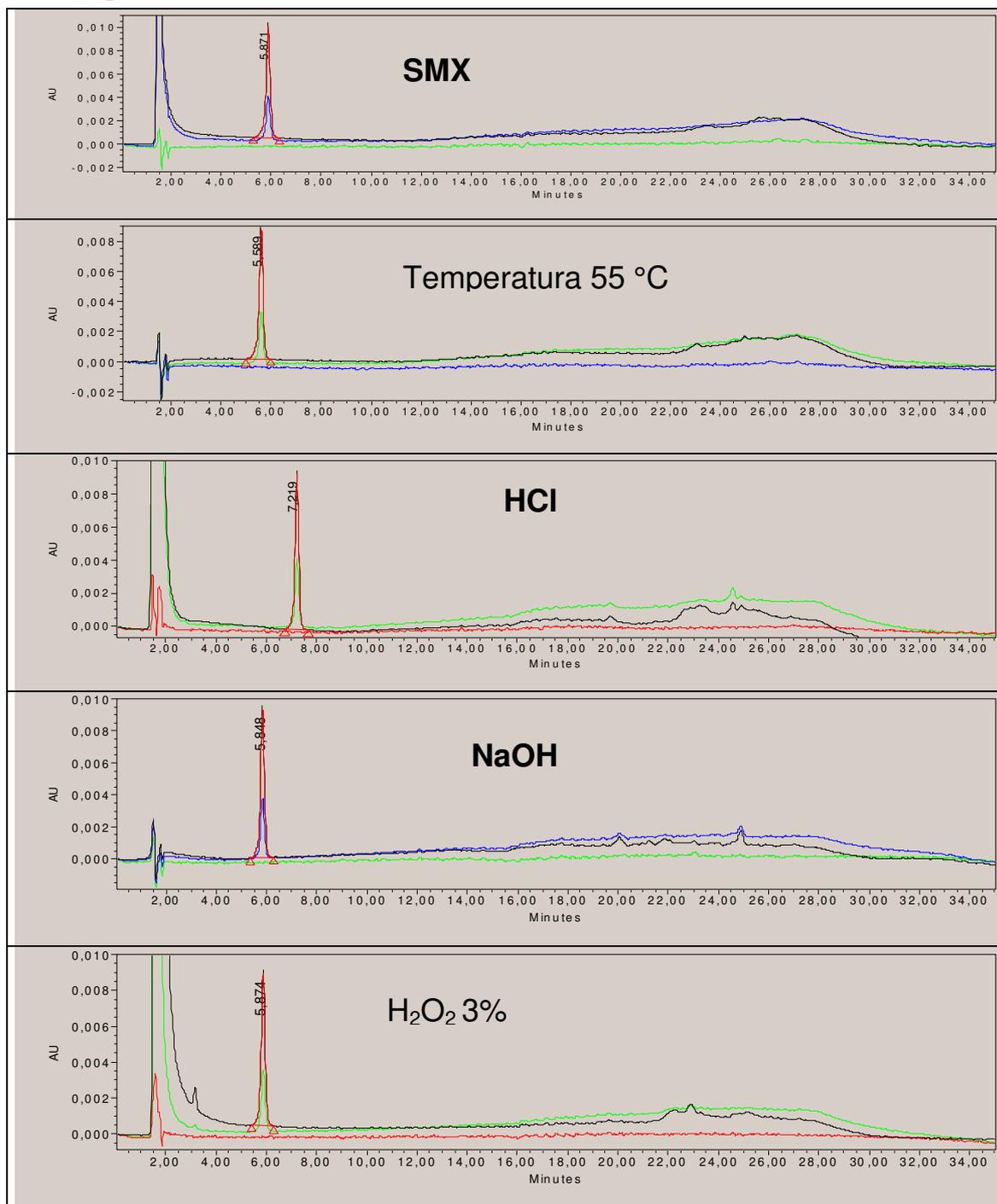


Figura 12. Estudo de estabilidade de SMX 1000 ng mL⁻¹ por HPLC. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 250 sulfonamidas

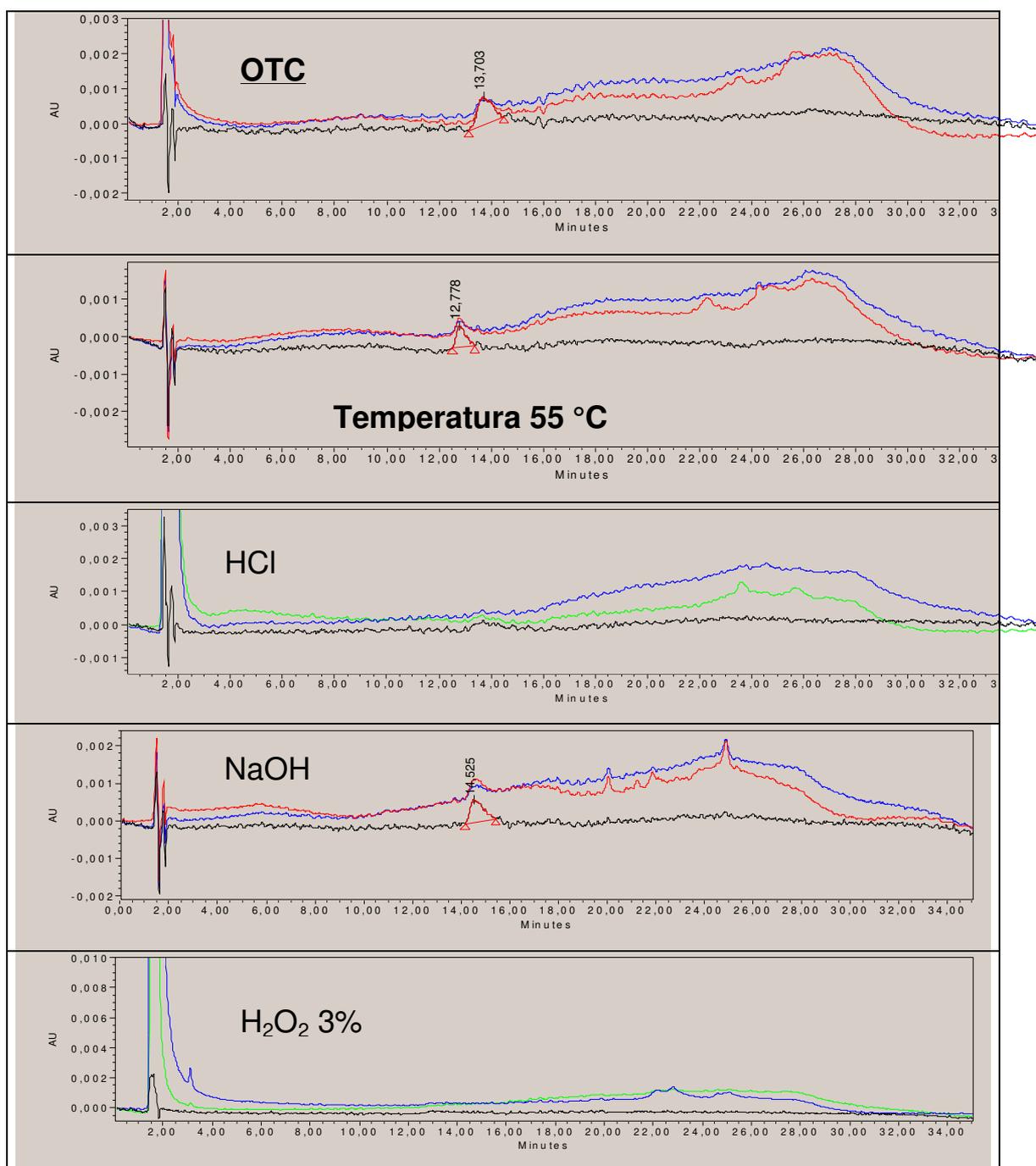


Figura 13. Estudo de estabilidade de OTC 1000 ng mL⁻¹ por HPLC. Condições de estresse 55 °C, HCL 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 385 tetraciclina

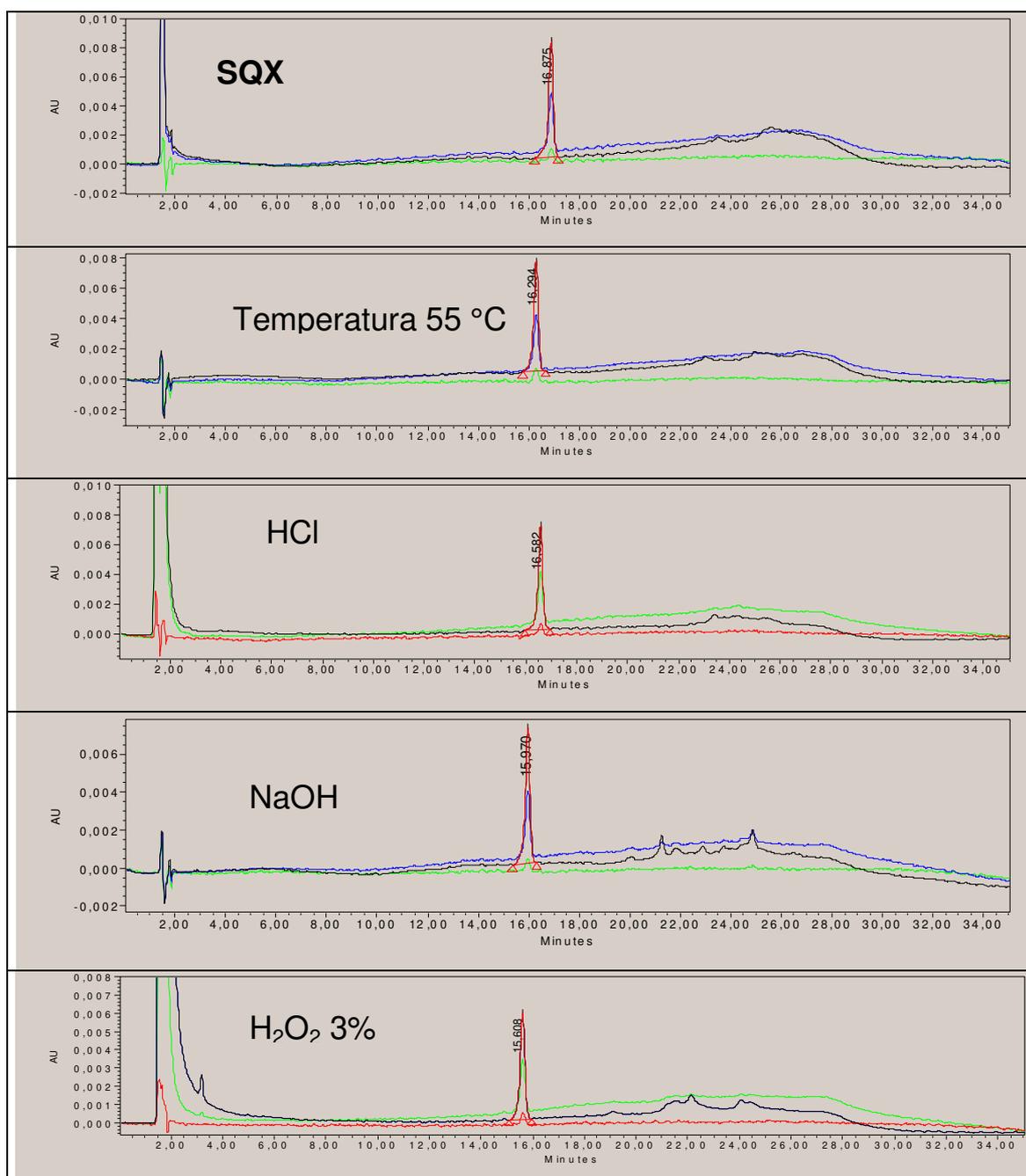


Figura 14. Estudo de estabilidade de SQX 1000 ng mL⁻¹ por HPLC. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 250 sulfonamidas.

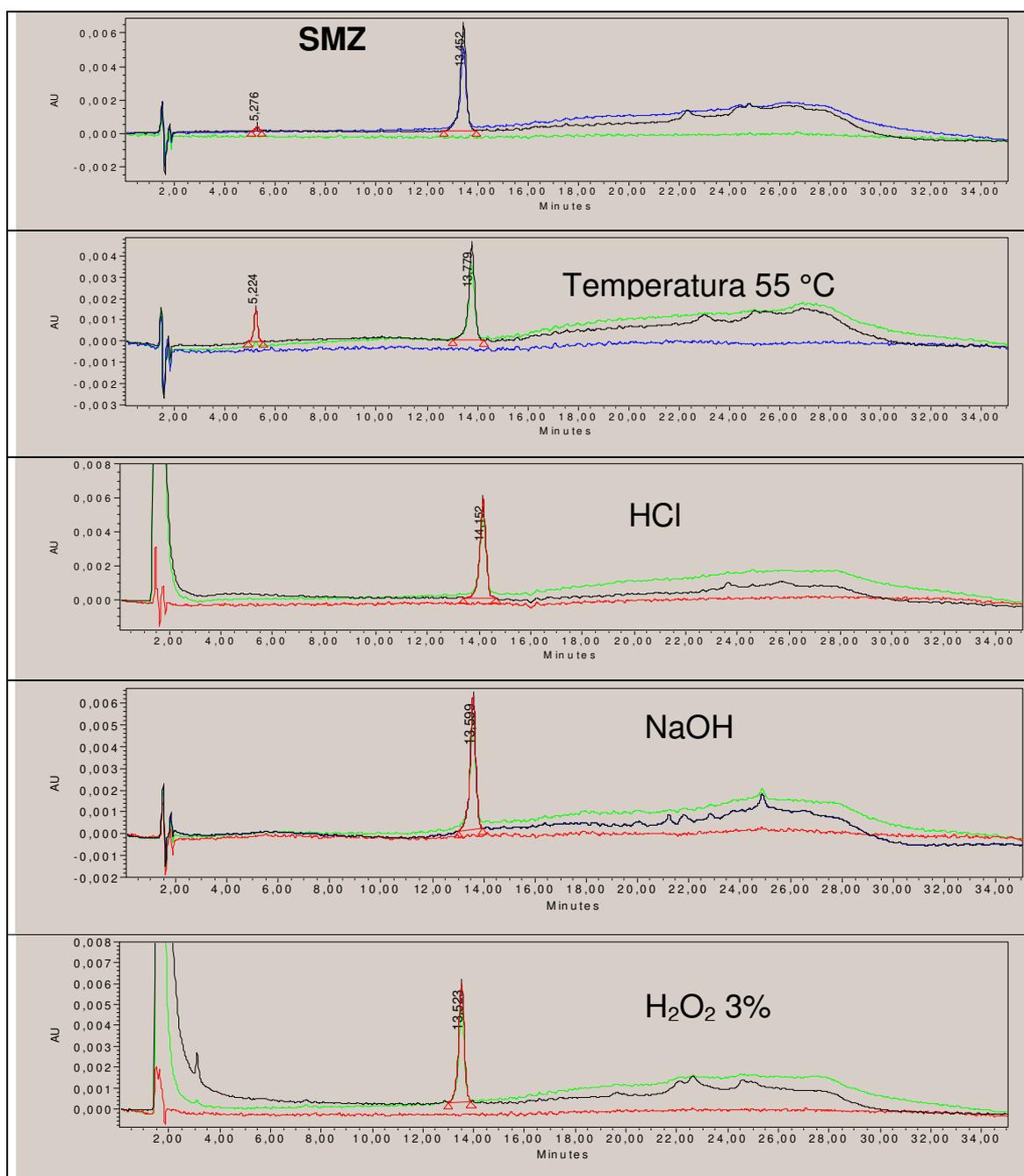


Figura 15. Estudo de estabilidade de SMZ 1000 ng mL^{-1} por HPLC. Condições de estresse $55 \text{ }^\circ\text{C}$, HCL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 3%. Condições de análise: FE: C_{18} . FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl_2 $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 250 sulfonamidas

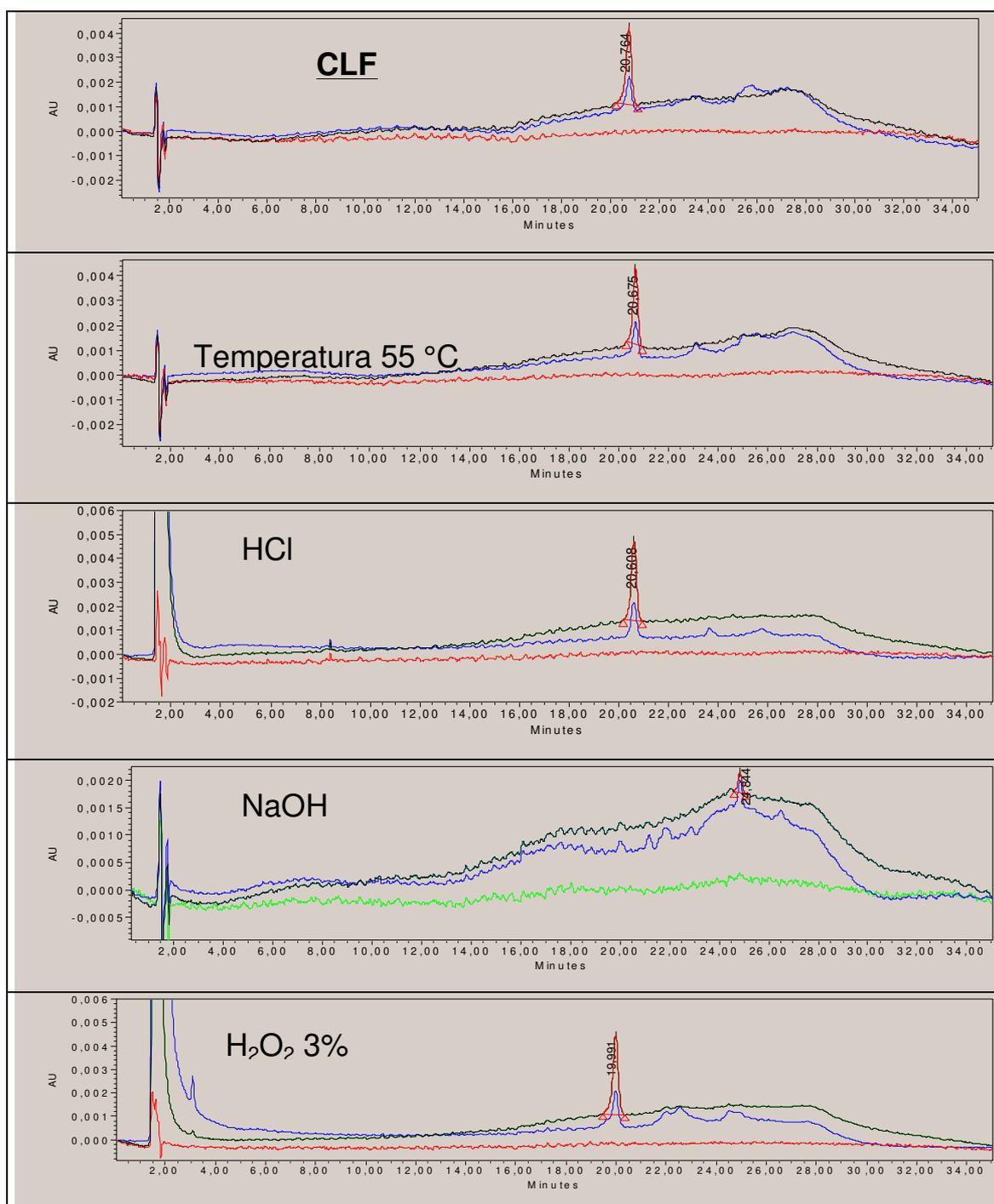


Figura 16. Estudo de estabilidade de CLF 1000 ng mL⁻¹ por HPLC. Condições de estresse 55 °C, HCL 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 278 cloranfenicol.

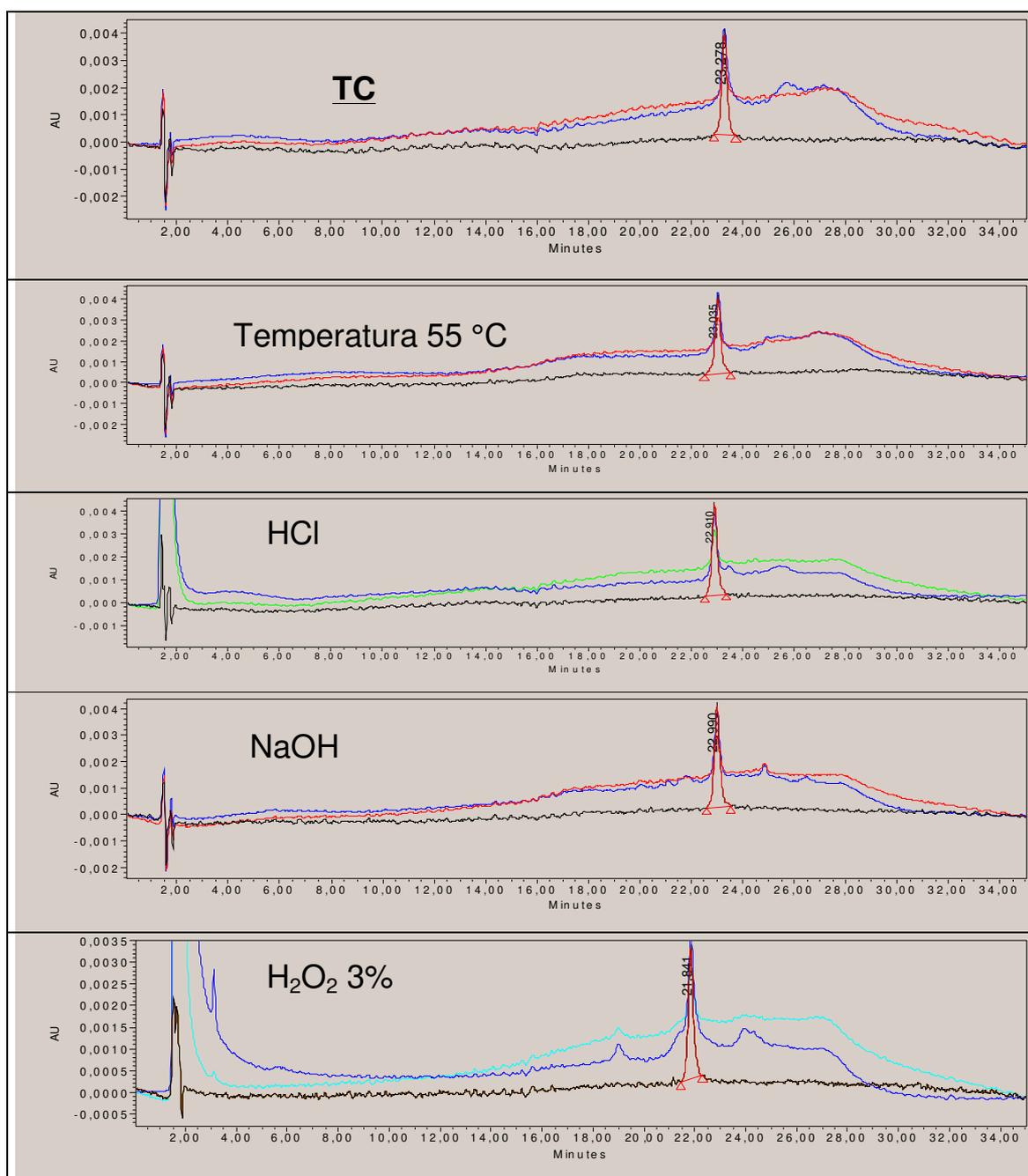


Figura 17. Estudo de estabilidade de TC 1000 ng mL^{-1} por HPLC. Condições de estresse $55 \text{ }^\circ\text{C}$, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio $0,075 \text{ mol L}^{-1}$, CaCl₂ $0,035 \text{ mol L}^{-1}$, Na₂EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. λ : 385 tetraciclina.

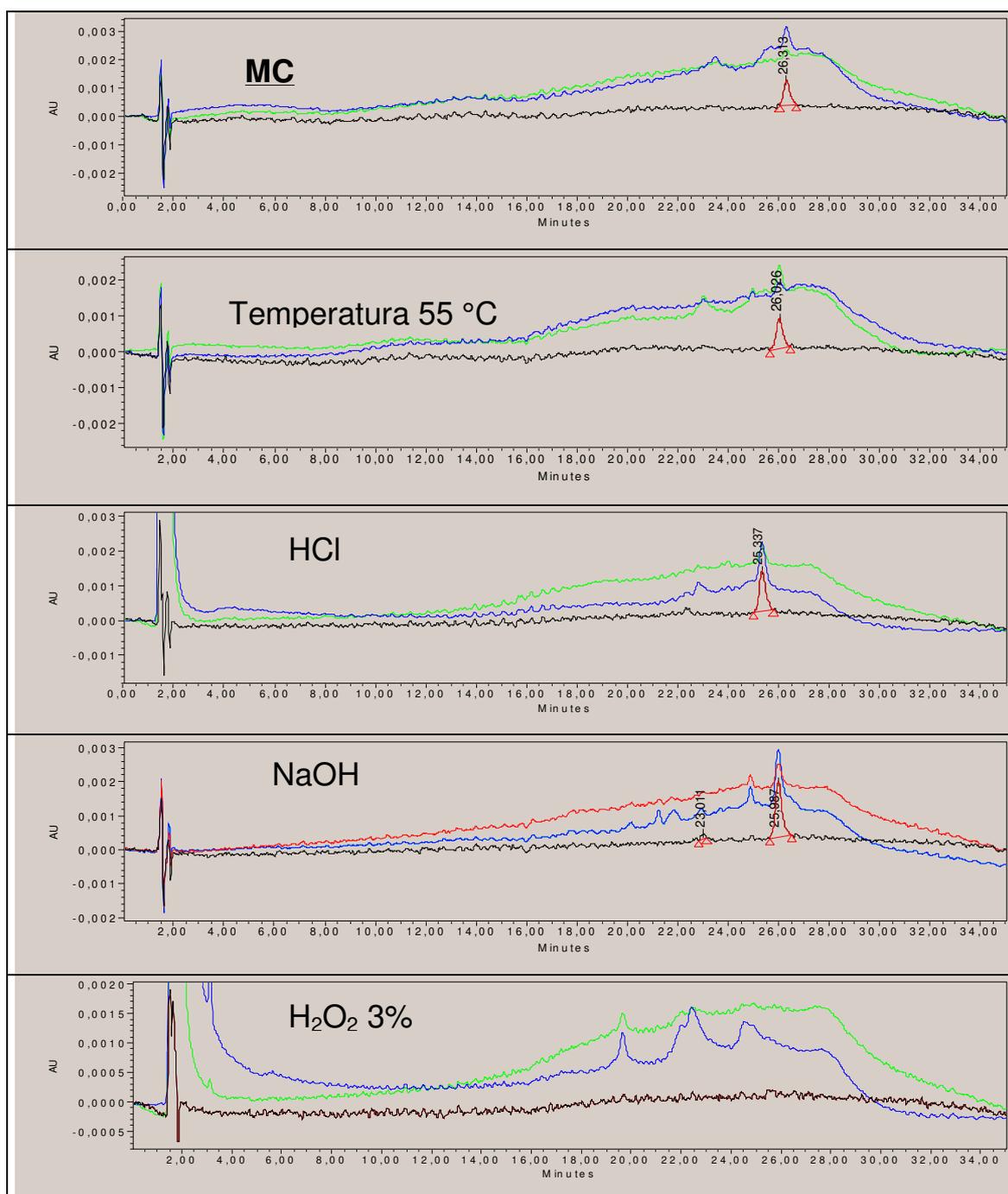


Figura 18. Estudo de estabilidade de MC 1000 ng mL⁻¹ por HPLC. Condições de estresse 55 °C, HCl 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 385 tetraciclina.

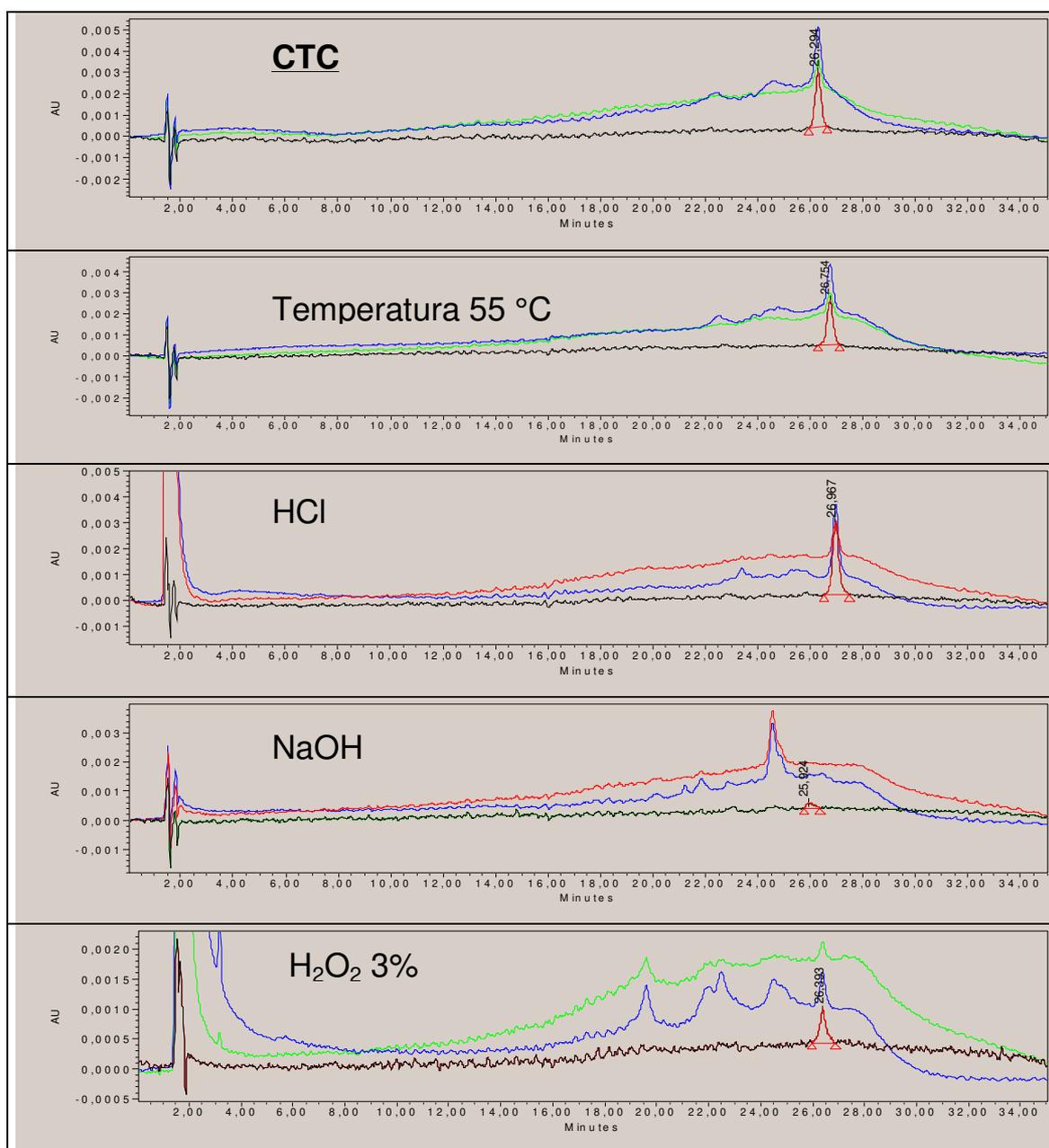


Figura 19. Estudo de estabilidade de CTC 1000 ng mL⁻¹ por HPLC. Condições de estresse 55 °C, HCL 0,1 mol L⁻¹, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂O₂ 3%. Condições de análise: FE: C₁₈. FM: FA (acetato de sódio 0,075 mol L⁻¹, CaCl₂ 0,035 mol L⁻¹, Na₂EDTA 0,025 mol L⁻¹) e FO 65:35 v/v de MeOH:ACN, pH 7. Eluição por gradiente: 90:10 FA:FO v/v – 50:50 FA:FO v/v (0-30 min) - 90:10 FA:FO v/v (30-37 min). Vazão: 0,7 mL min⁻¹. λ: 385 tetraciclina.