

Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência

Michela Denobile, Elizabeth de Souza Nascimento*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo

As tetraciclinas são compostos antibacterianos utilizados no gado leiteiro para tratamento de doenças infecciosas, como a mastite e também como aditivos em ração animal para melhorar a conversão alimentar. O uso das tetraciclinas pode acarretar a presença de resíduos destes fármacos no leite, principalmente se não forem utilizados de acordo com as indicações e se não for respeitado o período mínimo de eliminação dos antibióticos pelo leite. A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere no processo industrial de derivados, inibindo fermentos lácticos usados na produção de iogurtes e queijos, o que, conseqüentemente, causa sérios prejuízos econômicos. Resíduos de antibióticos no leite de consumo podem representar riscos à saúde humana, por causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, efeitos adversos à flora intestinal humana, prejudicando sua ação protetora local, além de propiciar a seleção de populações de bactérias resistentes. O objetivo deste estudo foi validar um método multirresíduo para determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite por extração com desproteinização ácida e identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos. O método apresentou limite de detecção e quantificação, respectivamente de 37,5 e 50 ng/mL, linearidade de 50-1600 ng/mL e coeficientes de determinação de 0,9996; 0,9994; 0,9996 e 0,9996 para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, recuperação entre 66,6 e 89,6%, com precisão e exatidão adequadas.

Unitermos

- Resíduos
- Antibióticos
- Tetraciclinas
- Leite
- HPLC

*Correspondência:

E. S. Nascimento
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas, FCF/USP
Av. Lineu Prestes, 580, bloco 13B,
05389-970, São Paulo -Brasil
E-mail:esnasci@usp.br

INTRODUÇÃO

Os antibióticos são amplamente utilizados no tratamento de doenças no gado leiteiro e também como suplementos em sua dieta. Sua administração pode ser feita via intramamária, para o tratamento de mastite; por via parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea), na terapia de infecções; por via intrauterina, 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 (Bishop, White, 1984).

A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere no processo industrial de derivados, inviabilizando a produção destes e, conseqüentemente, causando também sérios prejuízos econômicos, como, por exemplo, inibindo fermentos lácticos que são culturas de microrganismos usadas na produção de iogurtes, queijos e outros derivados (Boison *et al.*, 1994).

Os resíduos de antibióticos 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 antibióticos 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 (Brady, Katz, 1992; Brady, Katz, 1993; Honkanen-Buzalski, Reybroeck, 1997; Mitchell, 1998).

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o JECFA - Comitê para Aditivos Alimentares da FAO/WHO e o FDA dos Estados Unidos, estabelecem as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo ou Limite de Tolerância definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada antibiótico e sulfonamida aprovados para uso em animal produtor de alimento, sendo o valor de limite máximo de resíduo correlacionável à Ingestão Diária Aceitável obtida a partir de ensaios de experimentação animal avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade desses aditivos não intencionais (Kiser, 1984; Mitchell *et al.*, 1998).

No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários, seja de agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003).

No caso de medicamentos veterinários, até o momento, esses limites nacionais não foram definidos pelo

setor saúde e, portanto, vem-se utilizando o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), Instrução Normativa/MAA Nº 42, de 20 de dezembro de 1999, instituído pelo Ministério da Agricultura com a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária, bem como de poluentes ambientais (Brasil, 2001). Este programa estabelece como LMR para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina o valor de 100 ppb no leite para cada tetraciclina (Brasil, 1998).

Para monitorar os resíduos de antibióticos em leite, são comumente usados testes de triagem imunológicos e de inibição microbiológica, além de técnicas analíticas sensíveis e específicas para a identificação e quantificação de resíduos de antibiótico no leite. A técnica mais utilizada visando à segunda alternativa é a cromatografia à líquido de alta eficiência (Shenck, Callery, 1998).

As tetraciclinas possuem diferentes grupos funcionais na sua molécula, cuja presença torna mais complexos os mecanismos envolvidos na sua retenção nos sistemas cromatográficos. Como conseqüência da elevada polaridade das tetraciclinas, são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso. Em tais sistemas solventes, desempenham papéis importantes, a formação de pares iônicos, de complexação e a forte interação com grupos silanóis residuais. Estes fatores dificultam a quantificação das tetraciclinas (Pena *et al.*, 1997).

Na análise cromatográfica das tetraciclinas são utilizadas as colunas de fase reversa, cujo material de preenchimento permite a retenção destas, através de alguns mecanismos, tais como, formação de pares iônicos, efeitos de competição, locais ativos e não ativos, troca iônica e interação com grupos silanóis (Pena *et al.*, 1997). As tetraciclinas formam quelantes com íons metálicos e tendem a adsorver-se nos grupos silanóis na coluna de fase reversa. Estes problemas podem ser superados pela adição de ácido oxálico na fase móvel e pelo uso de colunas de poliestirenodivinilbenzeno (Oka *et al.*, 2000; Shenck, Callery, 1998). Assim, a fase móvel contendo ácido oxálico aparece em muitos artigos de análises de tetraciclinas em alimentos por CLAE a partir do final da década de 80 (Oka *et al.*, 2000).

A composição da fase móvel, portanto, desempenha papel muito importante no comportamento cromatográfico das tetraciclinas. Pena *et al.*, em 1997, ao testar diferentes tipos de colunas cromatográficas de fase reversa, verificaram que não eram necessárias colunas de melhor qualidade e *performance* se fosse escolhida uma fase móvel apropriada. Os melhores resultados foram obtidos em pH 2 com tampão oxalato, citrato ou fosfato. A adição de ácido

oxálico numa concentração adequada atua como eficiente agente complexante, evitando os picos com caudas e permitindo a determinação precisa das tetraciclina.

Alguns pesquisadores, como Furusawa (1999), utilizam colunas de sílica de fase reversa “*end-capping*”, que é um tipo de coluna submetida a um tratamento com trimetilclorosilano, em que ocorre a redução do número de grupos silanóis livres, enquanto outros usam sistemas baseados na formação de pares iônicos ou no uso de material de troca iônica. Contudo, a eficiência é pouco alterada (Pena *et al.*, 1997). O uso de colunas poliméricas preenchidas com poliestirenodivinilbenzeno permite boa resolução. Porém, segundo White *et al.*, (1993), as eficiências dessas colunas e as de fase reversa de tamanho de partículas comparáveis (5 mm) são similares (Pena *et al.*, 1997).

Como mencionado anteriormente as tetraciclina apresentam forte absorção UV, em torno de 270 e 360 nm em soluções ácidas e neutras, portanto o método de detecção mais convencional para sua determinação é a CLAE acoplada ao detector UV ou detector de arranjo de diodos (DAD), que permite análise em diferentes comprimentos de onda simultaneamente (Oka *et al.*, 2000).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e a doxiciclina em leite, que permita o controle da presença desses resíduos em amostras de leite de consumo.

Após a validação do método foram analisadas amostras de leite “*in natura*” obtidas em um laticínio em Cambuí, cidade localizada no extremo Sul de Minas Gerais, para avaliar a possível presença das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Para a otimização do método analítico foi utilizado um *pool* de leite pasteurizado tipo A, B, C e leite UHT desnatado, semi-desnatado e integral de diversas marcas obtidas comercialmente e submetidas a análise das tetraciclina para avaliação de possível resíduo. As amostras que apresentaram resultados negativos para as tetraciclina foram, então, utilizadas para a formação do *pool* de leite utilizado na validação do método em questão.

Os reagentes utilizados foram metanol e acetonitrila Omnisolv, grau de pureza cromatográfica, padrão de oxitetraciclina, teor 92,1%, fornecido pela Pfizer, padrão de tetraciclina, teor 98,2%, fornecido pela UNIVET S.A. Indústria Veterinária, padrão de cloridrato de

clortetraciclina, teor 79%, Sigma – Aldrich, e padrão de doxiciclina, teor 91,9%, fornecido pela Interchange Comércio Exterior Ltda. A água utilizada no preparo das soluções foi de grau reagente (resistividade >16 megaOhm), Millipore® (Milli Q).

Foi utilizado cromatógrafo líquido Hewlett Packard®, modelo 1100, equipado com detector de arranjo de diodos, acoplado ao computador modelo Vectra XM, série 4-5/150, com ChemStation para integração e processamento dos cromatogramas, e coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60 Å, 4 µm (3,9 x 150 mm).

A fase móvel “A” foi preparada misturando 900 mL de ácido oxálico 0,01 M, 99 mL de acetonitrila e 1 mL de trietilamina (90:9,9:0,1), filtrada através de filtro Millipore 0,45 µm e desgaseificada sob pressão.

A fase móvel “B” constituída de 100% de acetonitrila, foi filtrada através de filtro Millipore 0,45 µm e desgaseificada sob pressão.

Método

As amostras de leite foram homogeneizadas e enriquecidas, no momento do uso, com solução padrão de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em diferentes concentrações, para o preparo da curva de calibração e estudo dos parâmetros de validação.

Para a separação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas amostras, foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas: temperatura do termostato da coluna: 35 °C, fluxo da fase móvel: 1 mL/min, comprimento de onda: 363 nm, tempo de corrida: 10 minutos e fase móvel em sistema gradiente.

QUADRO 1 - Gradiente da fase móvel usada na detecção das tetraciclina

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Fluxo (mL/min)
0	90	10	1
1	90	10	1
3	85	15	0,8
3,5	85	15	1
7	85	15	1
10	90	10	1

A: Ácido oxálico 0,01 M : Acetonitrila: Trietilamina (90:9,9:0,1); B: Acetonitrila

Foi realizado o seguinte procedimento analítico para determinação da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite: Em tubo de centrifuga foi colocado

1 mL da amostra de leite e adicionado 0,35 mL de solução de ácido tricloroacético a 80% em acetonitrila; ultra-som por 10 minutos; agitação em vórtex por 1 minuto; centrifugação a 2500 rpm (1600 g) por 10 min; filtração através de filtro com membrana durapore 0,45 µm, 13 mm; injeção automática de 40 mL do filtrado no cromatógrafo líquido de alta eficiência, segundo as condições especificadas.

A validação do método proposto consistiu da avaliação dos parâmetros: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, recuperação, efeito da matriz, precisão inter e intra-dia, exatidão.

O limite de detecção, definido como a concentração mínima que se diferencia do zero com determinada confiabilidade (Chasin *et al.*, 1998), ou seja, a mínima concentração de cada tetraciclina adicionada à amostra que apresentou um coeficiente de variação menor que 20%, foi obtido a partir de diluições sucessivas da amostra adicionada de 50 ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em 10 replicatas, segundo o procedimento analítico descrito.

O limite de quantificação do método, definido como a menor concentração que se pode medir com precisão adequada (Chasin *et al.*, 1998), e com coeficiente de variação menor ou igual a 10%, foi obtido por adição de cada tetraciclina ao leite, em concentrações inferiores a 50 ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em 10 replicatas, segundo o procedimento analítico descrito.

A recuperação das tetraciclinas nas amostras de leite foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo cada tetraciclina, é submetida ao processo de extração, em relação a concentração obtida quando a amostra, sem a presença de nenhuma das tetraciclina, é submetida ao processo de extração, em que no filtrado final obtido são adicionados os padrões das tetraciclinas. As análises foram realizadas segundo o procedimento analítico descrito.

O estudo da faixa de linearidade do método foi realizado através da adição às amostras de *pool* de leite, solução-padrão da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, para se obter as seguintes concentrações: 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ng/mL. Estas amostras e amostra branco de leite foram analisadas em seis replicatas, segundo o procedimento analítico descrito.

Para avaliar a precisão, amostras de leite enriquecidas com três concentrações diferentes: 50, 400, 1200 ppb de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foram preparadas e em seguida analisadas em seis replicatas para cada concentração, segundo o procedimento analítico descrito, em um dia para o estabelecimento da precisão intra-dia, e em três dias consecutivos, para a precisão interdias.

Para o estudo da exatidão, amostras de leite enriquecidas com três concentrações diferentes: 100, 400, 1200 ppb de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina foram preparadas e, em seguida, analisadas em seis replicatas para cada concentração, segundo o procedimento analítico descrito. A exatidão foi avaliada através da inexatidão ou tendenciosidade (bias) e pode ser representada pela equação:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{concentr. Obtida} - \text{concentr. Esperada} \times 100}{\text{concentração Esperada}}$$

RESULTADOS

O perfil da separação cromatográfica da oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina obtido da análise do *pool* de leite adicionado encontra-se ilustrado na Figura 1.

As Tabelas I a VI apresentam os resultados relativos à validação realizada, enfocando os seguintes parâmetros: Limite de detecção, Limite de quantificação, recuperação, precisão e exatidão, respectivamente.

TABELA I - Resultados dos limites de detecção do método para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite

	Limite de Detecção* (ng/mL)	Coefficiente de variação (CV)(%)
oxitetraciclina	37,5	10,5
tetraciclina	37,5	18,3
clortetraciclina	37,5	11,3
doxiciclina	37,5	18,0

* Média dos valores das análises em 10 replicatas

TABELA II - Resultados dos limites de quantificação do método para a determinação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite

	Limite de Quantificação* (ng/mL)	Coefficiente de variação (CV) (%)
oxitetraciclina	50	3,8
tetraciclina	50	2,9
clortetraciclina	50	3,8
doxiciclina	50	4,2

* Média dos valores das análises em 10 replicatas

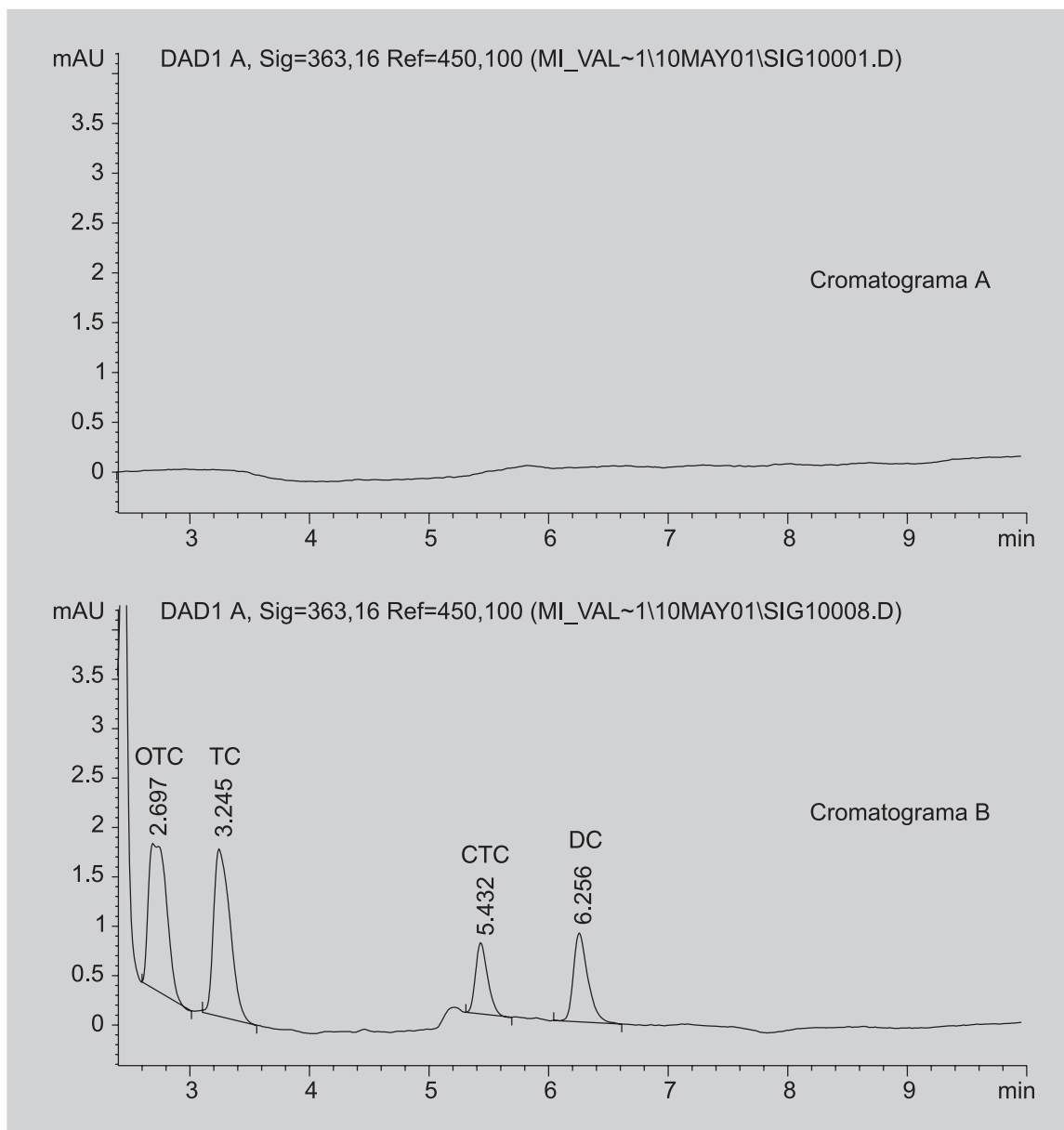


FIGURA 1 - Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraclina (CTC) e doxiciclina (DC) em leite. Cromatogramas: (A): branco e (B): padrão (400 ng/mL)

TABELA III - Recuperação de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina adicionada ao *pool* de leite, nas concentrações de 50; 400; 1200 ng/mL

Concentração do antibiótico no leite (ng/mL)	Oxitetraciclina Recuperação*	Tetraciclina Recuperação *	Clortetraciclina Recuperação*	Doxiciclina Recuperação*
50	81,5	80,9	84,4	72,3
400	77,8	79,4	87,1	66,6
1200	89,6	86,6	73,6	77,3

* Média dos valores das análises em seis replicatas

TABELA IV - Precisão do método analítico para determinação de oxitetraciclina e tetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação

Concentração de antibiótico em leite (ng/mL)	Oxitetraciclina Precisão intra-dia* CV (%)	Oxitetraciclina Precisão inter-dias (3 dias) * CV (%)	Tetraciclina Precisão intra-dia* CV (%)	Tetraciclina Precisão inter-dias (3 dias) * CV (%)
100	7,3	6,6	2,9	6,9
400	0,2	4,1	0,4	7,6
1200	0,6	6,3	0,6	9,9

* Média dos valores das análises em seis replicatas

TABELA V - Precisão do método analítico para determinação de clortetraciclina e doxiciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação

Concentração de antibiótico em leite (ng/mL)	Clortetraciclina Precisão intra-dia* CV (%)	Clortetraciclina Precisão inter-dias (3 dias) * CV (%)	Doxiciclina Precisão intra-dia* CV (%)	Doxiciclina Precisão inter-dias (3 dias) * CV (%)
100	4,2	10,6	3,3	8,7
400	1,3	1,9	2,2	5,3
1200	0,6	10,7	0,7	10,2

* Média dos valores das análises em seis replicatas

Tabela VI - Inexatidão do método analítico para determinação de oxitetraciclina em leite

Concentração de antibiótico em leite (ng/mL)	Oxitetraciclina Inexatidão (%)*	Tetraciclina Inexatidão (%)*	Clortetraciclina Inexatidão (%)*	Doxiciclina Inexatidão (%)*
100	-15,2	0,6	15,9	-15,9
400	-6,9	9,8	-10,3	-5,9
1200	0,5	6,6	9,7	0,5

* Média dos valores das análises em seis replicatas

As Figuras 2, 3, 4, 5 ilustram as curvas obtidas, respectivamente, de adicionados de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina em água e leite, nas concentrações de 50; 100; 200; 400; 800; 1600 ng/mL. Cada ponto corresponde a média dos valores encontrados na análise realizadas em seis replicatas.

DISCUSSÃO

Na escolha da coluna cromatográfica, observou-se na literatura que as colunas cromatográficas normalmen-

te utilizadas na separação das tetraciclina são as de sílica de fase reversa C8 ou C18. Num estudo prévio, realizado pelos autores do presente trabalho, foram avaliados a eficiência das colunas RP 18 e RP 8 de diferentes comprimentos e diâmetro interno, sendo selecionada a Nova-Pak Waters® RP 8, 60A°, 4 µm (3,9 x 150 mm) por apresentar boa separação entre os picos das tetraciclina e dos componentes endógenos do leite.

Foram testadas diversas composições e fluxos das fases móveis, baseadas no trabalho de Abete *et al.* (1997), que analisaram sete diferentes tetraciclina e no trabalho

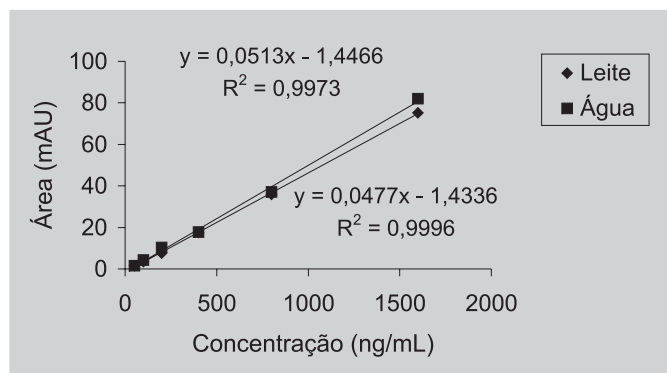


FIGURA 2 - Curvas de linearidade de oxitetraciclina em água e leite.

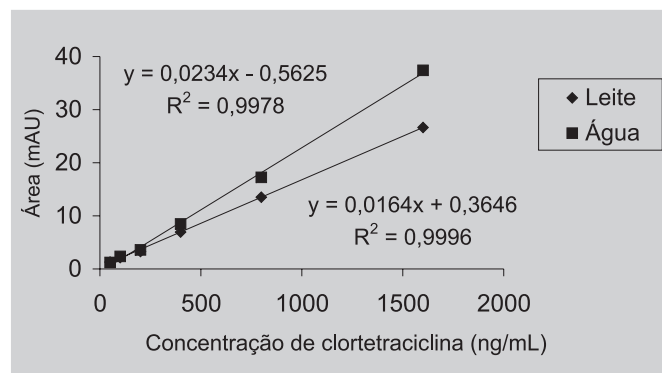


FIGURA 4 - Curvas de linearidade de clortetraciclina em água e leite.

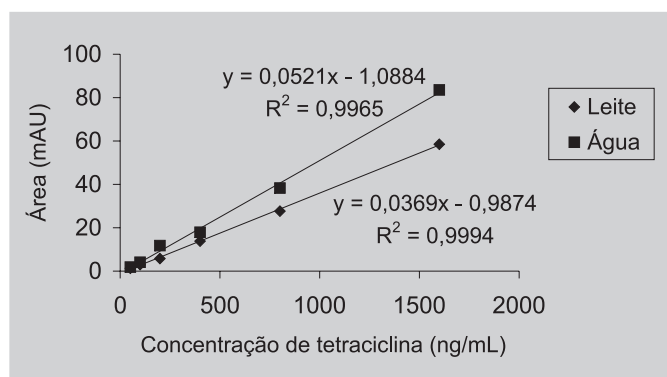


FIGURA 3 - Curvas de linearidade de tetraciclina em água e leite.

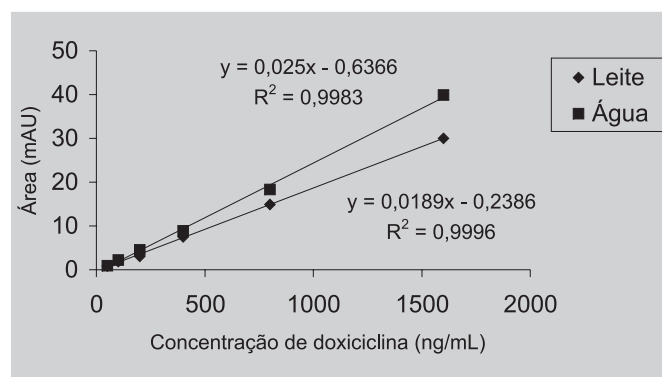


FIGURA 5 - Curvas de linearidade de doxiciclina em água e leite.

TABELA VII - Concentrações de oxitetraciclina determinadas nas amostras de leite “in natura” obtidas em um laticínio em Cambuí

Amostra	Concentração de oxitetraciclina (ng/mL)	Acima do LQ, abaixo do LMR	Acima do LQ e do LMR
A1	242,86		X
A2	58,47	X	
A3	97,32	X	
A4	88,08	X	
A5	58,20	X	
A6	59,72	X	
A7	196,35		X
A8	1639,24		X
A9	134,60		X
A10	55,83	X	

de Pena *et al.* (1999), que analisaram três diferentes tetraciclina simultaneamente, sendo que a fase móvel finalmente escolhida permitiu eficiente separação das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, bem como dos constituintes do leite.

Na escolha da técnica mais adequada de extração das tetraciclina, foram realizados estudos de algumas das diversas técnicas propostas na literatura atual. Inicialmente, avaliou-se a extração em fase sólida (SPE), utilizando colunas C8 e C18 segundo os trabalhos Oka *et al.* (1985),

Oka *et al.* (1994), Abete *et al.* (1997), e os resultados de recuperação obtidos com coluna C18 e com coluna C8 não foram satisfatórios para justificar o uso de um material de elevado custo, além da técnica mostrar-se mais laboriosa e apresentar baixa reprodutibilidade, como mencionado em alguns trabalhos de Oka *et al.* (2000), Fedeniuk, Shand (1998), Croubels *et al.* (1997).

A utilização de agentes desproteinizantes ácidos auxilia na extração das tetraciclinas de amostras biológicas. Esta técnica permitiu a obtenção de valores de recuperações satisfatórios, sendo realizada com algumas modificações, a partir do método proposto por Furusawa, (1999), que, utilizou como agente desproteinizante a solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% para extração da oxitetraciclina. Esta técnica apresenta a vantagem de fácil e rápida realização, pois o princípio de extração baseia-se em desproteinação da amostra, seguida de centrifugação e a injeção do sobrenadante filtrado no sistema cromatográfico.

De acordo com os parâmetros de validação avaliados observa-se que foi assegurada a confiança dos resultados analíticos, visando minimizar eventuais erros. Os dados relativos à linearidade demonstram que há correlação entre as concentrações das tetraciclinas na faixa de 50 a 1600 ng/mL e as respectivas áreas. Os coeficientes de determinação de 0,9996; 0,9994; 0,9996 e 0,9996, encontrados para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, respectivamente, permitem considerar que o método gera resultados proporcionais à concentração das substâncias em análise, dentro de uma faixa específica, sendo possível relacionar a medida dependente da concentração (Chasin *et al.*, 1998). A faixa de linearidade estudada incluiu o valor de LMR de tetraciclinas em leite estabelecido pelo Comitê Conjunto FAO/OMS para Aditivos Alimentares em Alimentos (JECFA), pelo Ministério da Agricultura brasileiro (100 ng/mL), além do valor de limite de tolerância estabelecido pelo FDA (300 ng/mL).

O limite de quantificação de 50 ng/mL e de detecção de 37,5 ng/mL, com CV respectivamente, menor ou igual a 10% e 20%, foram aceitos neste trabalho, já que alguns autores colocam a reprodutibilidade da resposta, precisão, fornecida pelo CV, como um critério que pode ser utilizado na determinação do LD e LQ (Chasin *et al.*, 1994; Jenke, 1996).

O limite de quantificação de 50 ng/mL para a oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, foi inferior ao valor de LMR de tetraciclinas em leite estabelecidos pelo FDA, pelo Comitê Conjunto FAO/OMS para Aditivos Alimentares em Alimentos (JECFA) e pelo Ministério da Agricultura brasileiro.

Os valores de recuperação nas concentrações de 50, 400 e 1200 ng/mL obtidos a partir de adicionados de padrões das oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina às amostras de *pool* de leite, forneceram resultados satisfatórios, ou seja, entre 66,6 e 89,6% para as tetraciclinas, nas diferentes concentrações. Furusawa, em 1999, obteve média de recuperação de 89,6% de oxitetraciclina adicionada ao leite nas concentrações de 100, 500 e 1000 ng/mL.

Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intra-dia e inter-dia, das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 100, 400 e 1200 ng/mL, foram adequados para todas as tetraciclinas nas diferentes concentrações, como pode ser observado nas Tabelas IV e V segundo o critério de aceitação para o coeficiente de variação, menor que 15% (Jenke, 1996, FDA, 1998).

Os resultados obtidos no estudo da exatidão, expressa em função de porcentagem de inexatidão, das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina nas concentrações de 100, 400 e 1200 ng/mL podem ser observados na Tabela VI. Estes resultados mostraram-se de acordo com o critério de aceitação que estabelece uma porcentagem de inexatidão menor ou igual a 15% (Jenke, 1996, FDA, 1998).

Os resultados dos estudos do efeito da matriz (Figura 1, 2, 3, 4) para avaliar se esta exerce alguma interferência na análise, mostraram que ao se comparar as curvas de linearidade obtidas em água e em leite, em todos os gráficos a matriz tem uma influência negativa em relação à curva em água, sendo possível visualizar essa diferença, pois as curvas não se sobrepuseram. Este resultado pode ser explicado pelo fato de as tetraciclinas se ligarem às proteínas presentes em leite, fato que não ocorre quando presentes na água. Desta forma, para garantir a confiabilidade da análise, optou-se por preparar sempre os calibradores em leite.

O método validado no presente trabalho mostrou-se apropriado para a verificação da presença de resíduos dos antibióticos tetraciclinas em amostras de leite, apresentando fácil execução, curto tempo de análise (aproximadamente 1 hora) e baixo custo.

Visto que a presença de resíduos de antibióticos no leite pode resultar em prejuízos econômicos e danos à saúde, torna-se fundamental monitorar a qualidade desse produto de consumo e demonstra a necessidade das indústrias de laticínios implantar sistema de fiscalização da qualidade do leite recebido, em relação à presença de resíduos de antibióticos, a fim de evitar prejuízos econômicos decorrentes de possíveis interferências no processo de produção de derivados causadas pela presença destes no leite.

ABSTRACT

Method validation for the determination of the antibiotics residues oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by high performance liquid chromatography

Tetracyclines are antimicrobial agents used in dairy cattle to treat infection diseases, as mastitis and also as additives in animal food to improve feed efficiency and growth. The use of tetracyclines can result in the presence of residue of these antimicrobials in the milk, especially if they are not used according to the label directions and if the minimum period of their elimination is not respected. The presence of antibiotic residues in the milk interferes in the dairy industrial process diminishing starter culture growth used in the yogurt and cheese production, causing strong economic loss. Antibiotic residue in the consumer milk may represent risk to the human health, allows allergic reactions in sensitive human beings, disorders of the intestinal flora damaging its local protection action and provides antibiotic resistance development. The objective of this study was to validate the multiresidue method to determine the oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by acidic desproteinization extraction and to identify and quantify them by high performance liquid chromatography with photodiode array detector. The method presented detection limit and quantification limit respectively of 37,5 and 50 ng/mL, linearity from 50 to 1600 ng/mL and correlation coefficient of 0,9996, 0,9994, 0,9996 and 0,9996 to the oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline respectively; and recovery between 66,6 and 89,2%, with good precisions and accuracy.

UNITERMS: Residues. Antibiotics. Tetracyclines. Milk. HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABETE, M.C.; GENTA, E.; SQUADRONE, S. Tetracycline nel latte: determinazione mediante HPLC/DAD. *Ind. Aliment.*, Pinerolo, v.36, p.753-755, 1997.
- BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Antibiotic residue detection in milk – A review. *J. Food Prot.*, Ames, v.47, n.8, p.647-652, 1984.
- BOISON, J.O.K.; KENG, L.J.Y.; MACNEIL, J.D. Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.77, n.3, p. 565-570, 1994
- BRADY, M.S.; KATZ, S.E. In vitro effect of multiple antibiotic/antimicrobial residues on the selection for resistance in bacteria. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.75, n.4, p.738-742, 1992.
- BRADY, M.S.; WHITE, N.; KATZ, S.E. Resistance development potencial of antibiotic/antimicrobial residue levels designated as “safe level”. *J. Food Prot.*, Ames, v.56, n.3, p.229-233, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões. Resíduos. Histórico. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/residuos.html>>. Acesso: 28 nov. 2001.
- BRASIL. Portaria n.72, de 03 junho de 1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.107, 08 jun. 1998. Seção 1, p.131. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL].
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões. Resíduos. Histórico. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/residuos.html>> Acesso: 28 nov. 2001
- BRASIL. Portaria n.72, de 03 junho de 1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, n.107, 08 de jun. 1998. Seção 1, p.131. [O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o Programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL].
- CHASIN, A.A.M.; CHASIN M.; SALVADOR, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.30, n.2, p. 49-53, 1994.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADOR, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.1, p. 1-6, 1998.

- CROUBELS, S.M.; VANOOSTHUYZE, K.E.I.; PETEGHEM, C.H.V. Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.690, p.173-179, 1997.
- FDA. U. S. Food and Drug Administration. Guidance for industry – Bioanalytical methods validation for human studies Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 14 dez 98.
- FEDENIUK, R.W.; SHAND, P.J. Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.812, p.3-15, 1998.
- FURASAWA, N. Rapid liquid chromatography determination of oxytetracycline in milk. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.839, p.247-251, 1999.
- HONKANEN-BUZALSKI, T.; REYBROECK, W. Antimicrobials In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Monography on residues and contaminants in milk and milk products*. Brussels: IDF, 1997. p.26-34. (International Dairy Federation, Special Issue 9701).
- JECFA. Summary and conclusions of the of the fiftieth meeting, Rome, 17-26 june 1998/ Veterinary drugs and BST/ antimicrobial agents/ chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline. Disponível em: <<http://www.jecfa.ilsa.org/evaluation.cfm>>. Acesso em 10 jul. 2000.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, New York, v. 19, n.5, p.719-736, 1996.
- KISER, J.S. Subtherapeutic uses of antibiotics and sulfonamides in animal agriculture. In: STEELE, J.H.; JUKES, T.H.; DUPONT, H.L.; CRAWFORD, L.M., eds. *Antibiotics, sulfonamides, and public health*. Boca Raton: CRC Press, 1984. v.1, p. 81-107 (CRC Handbook Series in Zoonoses section D).
- MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Prot.*, Ames, v.61, n.6, p.742-756, 1998.
- OKA, H.; MATSUMOTO, H.; UNO, K.; HARADA, K.; KADOWAKI, S.; SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C₁₈ cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.325, p.265-274, 1985.
- OKA, H.; IKAI, Y.; HAYAKAWA, J.; MASUDA, K.; HARADA, K.; SUZUKI, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part XIX: Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thin-layer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v. 77, n.4, p.891-895, 1994.
- OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.882, p. 109-133, 2000.
- PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclina: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. *Rev. Port. de Farm.*, Lisboa, v. XLVII, n.4, p.149-154, 1997.
- PENA, A.L.S.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography with postcolumn, derivatization and fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.82, n.1, p.55-60, 1999.
- SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.812, p. 99-109, 1998.
- WHITE, C.R.; MOATS, W.A.; KOTULA, K.L. Optimization of a liquid chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.76, n.3, p.549-554, 1993.

Recebido para publicação em 03 de outubro de 2003.