

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE OXITETRACICLINA, TETRACICLINA E CLORTETRACICLINA EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA¹

Iara C. A. RUELA²; Josefa A. LIMA³; Scheilla V. C. de SOUZA²; Roberto G. JUNQUEIRA^{2,*}

RESUMO

Um método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência foi otimizado e validado. Ensaios intralaboratoriais empregando soluções padrão, brancos de amostras e amostras adicionadas de soluções padrão dos antimicrobianos foram realizados para avaliação da linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação do método. As amostras foram homogeneizadas, tratadas com solução tampão de succinato de sódio pH 4,0 e centrifugadas, descartando-se o precipitado. As tetraciclinas foram removidas do sobrenadante por quelação com íons cobre reversivelmente ligados à resina quelante e eluídas com tampão McIlvaine-EDTA pH 4,0. As médias de recuperação para as tetraciclinas foram de 76,2 a 104,9% com coeficiente de variação na faixa de 1,4 a 18,9%. Limites de detecção de 10, 15 e 40ng/mL e limites de quantificação de 10, 20 e 50ng/mL foram determinados para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente.

Palavras-chave: leite; resíduos; tetraciclinas; cromatografia líquida de alta eficiência.

SUMMARY

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINATION OF OXYTETRACYCLINE, TETRACYCLINE AND CHLORTETRACYCLINE RESIDUES IN MILK BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. A method for determination of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline residues in milk by high performance liquid chromatography was optimized and validated. Linearity, selectivity, trueness, precision, limits of detection and quantitation were evaluated by in-house validation procedures employing reference materials, sample blanks and spiked samples. Milk samples were homogenized, treated with sodium succinate pH 4.0 buffer and centrifuged, discarding the precipitate. Tetracyclines were removed from the supernatant by chelating with metal ions bound to a chelating resin and eluted with McIlvaine-EDTA pH 4.0 buffer. Mean recoveries for tetracyclines ranged from 76.2 to 104.9% with coefficients of variation from 1.4 to 18.9%. Detection limits of 10, 15 and 40ng/mL and quantitation limits of 10, 20 and 50ng/mL were determined for oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline, respectively.

Keywords: milk; residues; tetracyclines; high performance liquid chromatography.

1 - INTRODUÇÃO

As tetraciclinas, antimicrobianos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces* spp, são amplamente utilizadas no tratamento e prevenção de várias doenças que atingem animais produtores de alimentos [20,29]. Estes antimicrobianos agem principalmente contra a maioria das bactérias Gram positivas, sendo menos ativos contra microrganismos Gram negativos [32].

Entretanto, quando estes antimicrobianos são utilizados de maneira indevida ou quando o período de carência estabelecido não é respeitado, resíduos podem ser detectados no leite ou na carne dos animais expostos, causando impactos na saúde pública. Além do possível efeito toxicológico direto, os resíduos de antimicrobianos podem acarretar reações alérgicas em consumidores sensíveis, cujos efeitos variam de reações cutâneas, náuseas, vômitos, podendo chegar a choque anafilático [10]. Concentrações mínimas de antimicrobianos podem induzir a seleção de bactérias multirresistentes, capazes de transferir esta resistên-

cia a outras bactérias [9,15]. O leite contaminado por resíduos de antimicrobianos pode, ainda, afetar a indústria de laticínios, inibindo total ou parcialmente as culturas utilizadas na produção de derivados lácteos como iogurtes e queijos [5,24].

A maioria dos países estabelece, em suas legislações sanitárias, regulamentação para o uso de antimicrobianos na pecuária, definindo os limites máximos de resíduos (LMR) nos alimentos de origem animal. Estes limites são instituídos de acordo com as recomendações do CODEX ALIMENTARIUS [8], podendo ser inferiores aos recomendados se houver justificativa para tal decisão [13]. No Brasil, foram estabelecidos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRB) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) níveis máximos de 100ng/mL para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite, individualmente ou em combinação, conforme limites estabelecidos pelo CODEX ALIMENTARIUS [8]. Entretanto, para fiscalização e monitoramento eficientes dos níveis de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal, são necessários métodos analíticos validados que garantam a segurança e confiabilidade dos resultados gerados [12,30].

Os métodos para detecção de resíduos de antimicrobianos em alimentos baseiam-se em três princípios básicos: o efeito direto em um microrganismo teste; o reconhecimento da forma tridimensional molecular, utilizado em técnicas imunológicas e o uso das caracte-

¹ Recebido para publicação em 04/12/2003. Aceito para publicação em 16/12/2004 (001256).

² Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia (FAFAR), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Tel. (31) 34996913, FAX (31) 34996730, e-mail junqueira@dedalus.lcc.ufmg.br

³ Setor de Cromatografia, Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MG), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

* A quem a correspondência deve ser enviada.

terísticas físico-químicas dos antimicrobianos, que fundamentam técnicas cromatográficas e/ou espectrométricas [30].

Dentre as desvantagens das técnicas microbiológicas, destacam-se: baixa seletividade na identificação do antimicrobiano; restritos limites de detecção para muitos compostos; demora na obtenção dos resultados e incidência de resultados falsos positivos [19, 21, 28]. Já as técnicas imunológicas não são seletivas o bastante para a identificação inequívoca de um composto, necessitando métodos físico-químicos de confirmação. Entretanto, permitem que muitas amostras sejam analisadas em pouco tempo [30,36]. Os métodos físico-químicos, como os que empregam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possuem maior sensibilidade para detectar resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal [3, 6, 14, 23]. Estes métodos requerem sempre algum tipo de extração e, ou, desproteinização prévia, dependendo da matriz e resíduo a ser pesquisado, além de instrumentação complexa e pessoal treinado [2, 23, 27, 35]. No entanto, a capacidade desses métodos em identificar seletivamente e quantificar níveis de resíduos na ordem de ng/mL ou ng/g tem garantido seu uso, principalmente para a confirmação de amostras positivas em métodos de triagem [24,25].

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método para a análise de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por CLAE [1,6], capaz de contemplar os valores de LMR regulamentados na legislação nacional [4] e internacional [8], para ser adotado nas atividades de monitoramento do PNCRB do MAPA.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Amostras

Amostras de leite cru (de aproximadamente 5 litros) foram obtidas por ordenha manual de gado bovino não tratado com tetraciclina, na fazenda experimental do MAPA/Escola de Veterinária da UFMG. Estas amostras foram homogeneizadas, alíquotadas, identificadas e mantidas sob congelamento (-14°C a -18°C) até o momento das análises. Para os experimentos de validação, cerca de 100 alíquotas de 5mL foram utilizadas como brancos ou adicionadas de padrão das tetraciclina, em 10 níveis de concentração e pelo menos 5 replicatas por nível.

2.2 – Reagentes e solventes

Os ácidos succínico e cítrico foram Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Sulfato de cobre, fosfato de sódio dibásico e EDTA foram Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido oxálico foi Sigma (Saint Louis, MO, EUA). Todos os reagentes utilizados foram grau para análise.

Os solventes metanol, etanol e acetonitrila foram grau CLAE Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

A resina quelante com íons cobre Chelating Sepharose Fast Flow foi da Pharmacia (Uppsala, Suécia).

2.3 – Padrões de referência

As soluções padrão foram preparadas e padronizadas segundo a AOAC INTERNATIONAL [1] utilizando materiais de referência Sigma (Saint Louis, MO, EUA). As soluções estoque (100µg/mL) de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina foram preparadas, separadamente, em metanol e armazenadas em frascos âmbar, devidamente vedados, sob temperaturas de -14 a -18°C, até o momento da utilização.

A partir destas soluções foram obtidas soluções padrão intermediárias contendo 1µg/mL de cada composto em metanol, sendo armazenadas como descrito acima.

As soluções padrão de trabalho, utilizadas nas curvas de calibração, foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição das soluções intermediárias em tampão McIlvaine-EDTA pH4,0. Esse tampão foi preparado por diluição de 37,2g de EDTA para 1000mL de solução McIlvaine, obtida pela diluição de 12,9g de ácido cítrico e 10,9g de fosfato de sódio dibásico em água destilada e deionizada para 1000mL [1,6].

2.4 – Equipamentos

Agitador de tubos Heidolf Top-mix (Mannheim, Alemanha), banho de água com agitação Yamato BT25 (Tóquio, Japão), centrífuga Jouan E 96 (Winchester, VA, EUA) e cromatógrafo Termo Separation Products TSP (Fremont, CA, EUA) constituído dos seguintes módulos: degaseificador SCM 1000, controlador do sistema (interface) SN 4000, bomba quaternária P 4000, injetor manual Rheodyne ID 0495, injetor automático AS 3000, detector ultravioleta UV-2000, microcomputador Pentium MMX 166 MHz com software TSPC 1000 acoplado a impressora HP 692C.

2.5 – Otimização e validação do método

O método otimizado e validado foi baseado nos descritos por CARSON [6] e pela AOAC INTERNATIONAL [1].

2.5.1 – Procedimentos analíticos otimizados

- Etapa de extração

As amostras de leite (brancos) foram descongeladas em temperatura ambiente ou em banho de água com agitação a aproximadamente 50°C, homogeneizadas e deixadas à temperatura ambiente para separação da gordura.

Alíquotas de 5mL foram pipetadas para tubos de centrífuga de polipropileno de 50mL. Amostras adicionadas de padrão foram preparadas pela adição de solução intermediária aos brancos, com posterior homogeneização em agitador de tubos.

As camadas de gordura foram retiradas com pipeta de Pasteur e, quando necessário, as amostras eram centrifugadas a uma velocidade de 1.500xg durante 10 minutos a 10°C.

Foram adicionados às amostras 10mL de tampão succinato de sódio pH 4,0, seguido de homogeneização

em agitador de tubos e centrifugação a 1.500xg por 30 minutos a 10°C, descartando-se o precipitado.

- Etapa de purificação

- Preparo das minicolunas com resina quelante de *Sepharose*

Suspensões de resina quelante em etanol 20% contendo íons cobre foram homogeneizadas e transferidas em duas alíquotas de 0,7mL para minicolunas de poli-propileno Biorad Poly-Prep (0,8x4 cm), deixando escoar a solução de etanol a 20% em água contida na suspensão da resina.

As minicolunas foram lavadas com três porções de 2mL de água destilada e deionizada e adicionadas de 2mL de solução de sulfato de cobre 10mM. Posteriormente, as minicolunas foram novamente lavadas com duas porções de 2mL de água destilada e deionizada. O volume final da resina quelante mantido nas minicolunas foi de 1,0 a 1,2mL, com cerca de 0,7mL da porção superior corada de azul, indicando a adsorção do íon cobre.

- Transferência dos extratos para as minicolunas

Após centrifugação, os sobrenadantes obtidos no item “Etapa de extração” foram transferidos para as minicolunas em 3 porções de cerca de 5mL.

Após todo o líquido ter escoado, as minicolunas foram lavadas seqüencialmente com 2mL de solução tampão succinato de sódio pH 4,0; 2mL de água destilada e deionizada; 2mL de metanol e novamente com 2mL de água destilada e deionizada.

Foram acoplados às minicolunas balões volumétricos de 5mL e adicionados 4mL de tampão McIlvaine-EDTA pH 4,0 para eluir as tetraciclina, completando-se o volume com este tampão. Neste ponto as resinas quelantes ficavam incolores. Os procedimentos foram executados usando fluxo da gravidade.

- Regeneração das minicolunas

Após eluição das amostras, as minicolunas foram lavadas com 3mL de tampão McIlvaine-EDTA pH4,0, três porções de 2mL de água destilada e deionizada e, finalmente, 10mL de etanol a 20%, deixando um excesso de etanol de aproximadamente 3mL para preservação da resina quelante. As minicolunas foram armazenadas sob temperatura de 2a10°C. Antes de cada uso, as minicolunas foram agitadas por inversão manual para ressuspender e homogeneizar a resina. Segundo recomendação de CARSON [6], o número de utilizações de uma mesma minicoluna foi igual a 6.

- Etapa de detecção e quantificação

As condições cromatográficas foram: volume de injeção de 150µL; coluna PLRP-S, 5µm, 150x4,6mm; detector UV a 355nm; fase móvel ácido oxálico 0,01M:acetonitrila:metanol 72:20:8 (v/v/v); fluxo de 1mL/min; sistema isocrático e integração pelo parâmetro altura dos picos obtidos nos cromatogramas.

2.5.2 – Validação do método otimizado

No processo de validação intralaboratorial [12,34] soluções padrão, brancos de amostras e amostras adicionadas de soluções padrão foram submetidos aos procedimentos analíticos otimizados.

- Linearidade e limite de detecção do equipamento

A linearidade foi avaliada pela determinação da capacidade do sistema de medição em obter resultados proporcionais à concentração das tetraciclina em uma determinada faixa de concentração. Para tal, foram construídas curvas de calibração com soluções de trabalho das tetraciclina em concentrações na faixa de 5 a 250ng/mL, determinando-se, por regressão linear, as equações das curvas. Foram avaliados o coeficiente de determinação, a significância da regressão, o desvio da linearidade e os desvios da regressão. Os procedimentos foram realizados em três dias diferentes para avaliação da reprodutibilidade dos resultados.

Para a determinação do limite de detecção do equipamento foram injetadas soluções padrão de trabalho em concentrações cada vez menores, sendo determinadas as menores massas de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina detectadas pelo equipamento, nas condições estabelecidas e que apresentassem um sinal, no mínimo, três vezes o valor do maior sinal de ruído [12].

- Seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação do método

Para a verificação da seletividade do método foram analisadas amostras adicionadas de soluções padrão em dois níveis de concentração (100 e 200ng/mL) e brancos de amostras, em cinco replicatas cada. O perfil dos registros obtidos para estas amostras foi verificado, sendo observadas a resolução dos picos das substâncias pesquisadas, a presença de interferentes e a concordância entre o tempo de retenção de cada tetraciclina nos cromatogramas das soluções padrão de trabalho e nos cromatogramas das amostras.

Para avaliação da exatidão, precisão e limites de detecção e de quantificação do método foram analisados brancos de amostras e amostras adicionadas de soluções padrão em pelo menos sete níveis de concentração, com um mínimo de cinco replicatas por nível. Para a oxitetraciclina foram estudados 5; 10; 15; 20; 30; 50; 75; 100; 150 e 200ng/mL; para a tetraciclina 10; 15; 20; 30; 50; 75; 100; 150 e 200ng/mL e para a clortetraciclina 30; 40; 50; 75; 100; 150 e 200ng/mL.

Com o objetivo de avaliar a precisão do método, ou seja, a distribuição dos resultados de testes individuais em torno de sua média [12], foram avaliados os coeficientes de variação (desvios padrão relativos) dos resultados, em um mesma concentração, para cada substância pesquisada. A exatidão foi avaliada pela comparação entre os valores teóricos das adições de tetraciclina e os valores obtidos nos ensaios [12], sendo

expressa em termos de porcentagem de recuperação. Foram utilizados, como referência para avaliação dos coeficientes de variação e porcentagens médias de recuperação, os critérios de aceitabilidade determinados pelo CODEX ALIMENTARIUS [8] e adotados pelo MERCOSUL [22] (Tabela 1).

TABELA 1. Níveis de concentração e respectivos valores de recuperação média e coeficiente de variação aceitáveis para resultados quantitativos

Concentração ($\mu\text{g/kg}$ ou L)	Exatidão	Precisão
	Recuperação média (%)	Coefficiente de variação intralaboratorial (%)
≤ 1	50 a 120	35
1 a 10	60 a 120	30
10 a 100	70 a 110	20
> 100	80 a 110	15

Fonte: CODEX [8], MERCOSUL [22].

O limite de quantificação do método foi determinado como a menor concentração de analito que pôde ser detectada em todas as replicatas estudadas [12,18], contemplando os valores de porcentagens médias de recuperação e de coeficientes de variação estabelecidos como aceitáveis [8,22].

O limite de detecção do método foi a menor concentração de analito que foi detectada em todas as replicatas estudadas [12,18], embora não tenham sido contemplados os valores definidos como aceitáveis [8,22].

Nas concentrações correspondentes a estes limites foram analisadas amostras em dez replicatas.

2.6 - Análise estatística

Para a determinação da consistência dos resultados e comparação entre as médias de recuperação para diferentes concentrações dos analitos foram utilizadas análises de variância para delineamento inteiramente casualizado ($\alpha=0,05$) [31].

Na avaliação da melhor condição de integração, comparando as médias da recuperação entre área e altura dos picos nos cromatogramas, foi utilizado teste de t emparelhado ($\alpha=0,05$) [33].

Para a avaliação da precisão do método, em função dos níveis de concentração das tetraciclina, foi aplicada a seguinte equação, relacionando o efeito da concentração (x) com os coeficientes de variação (CV):

$$CV \propto \frac{c \cdot 2 \cdot x}{d \cdot \sqrt{x}} \quad (\text{Equação 1})$$

sendo c e d parâmetros desta equação.

A equação 1 foi rearranjada para fornecer uma função linear que relacionasse o inverso da concentração do antimicrobiano ao CV, isto é:

$$CV \propto \frac{1}{d} \cdot 2 \cdot \frac{c}{d} \cdot \frac{1}{x} \quad (\text{Equação 2})$$

sendo as estimativas de c e d calculadas por regressão linear ($Y=a+bX$), em que $CV=Y$, a variável dependente; $1/d=a$, o coeficiente linear; $c/d=b$, o coeficiente angular e $1/x=X$, a variável independente.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Otimização do método

Para minimizar a ligação de resíduos de aminoácidos como histidina, cistina ou triptofano aos íons metálicos divalentes da resina, interferindo com formação de complexos entre as tetraciclina e os íons metálicos [7], parte das proteínas foi removida do leite pelo tratamento com tampão succinato de sódio pH 4,0. Após este tratamento das amostras, seguido de centrifugação, os sobrenadantes apresentavam-se límpidos, com satisfatória separação da fase sólida, não sendo constatadas perdas das tetraciclina. Outros autores também observaram que as tetraciclina mantêm-se estáveis em soluções ácidas, recomendando o emprego de succinato de sódio pH4,0 [6,7] ou dos ácidos clorídrico, fosfórico e cítrico [17] na etapa de extração. OKA et al. [29] extraíram tetraciclina do leite adicionando 50mL de tampão McIlvaine- Na_2EDTA pH4,0, centrifugando a amostra, purificando o extrato com coluna C_{18} e concentrando o extrato purificado por evaporação.

No método original, CARSON [6] propôs eluição das tetraciclina das minicolunas com 2,5mL de tampão McIlvaine-EDTA- NaCl pH4,0. Na CLAE foi adotado um sistema gradiente composto por 100% de ácido oxálico 0,01M com fluxo de 1mL/min, durante 1 minuto, seguido de mudança linear para ácido oxálico 0,01M:metanol:acetonitrila, 70:8:22 (v/v/v), durante 5 minutos. Esta composição foi mantida durante 11 minutos retornando linearmente para a condição inicial.

TABELA 2. Resolução e tempo de retenção das tetraciclina nas condições gradiente e isocrática

Tetraciclina	Gradiente		Isocrática	
	Resolução USP/EP*	Tempo de retenção	Resolução USP/EP*	Tempo de retenção
Oxitetraciclina	1,43/1,38	7,7	1,68/1,79	4,0
Tetraciclina	1,43/1,38	8,2	2,89/2,95	4,8
Clortetraciclina	2,45/2,56	10,7	7,9/8,71	8,9

*Resoluções calculadas conforme sugerido por USP [38] e EP [11].

No procedimento otimizado neste trabalho foi utilizado um volume de 4mL de tampão McIlvaine-EDTA pH4,0 para garantir a completa eluição dos resíduos de tetraciclina das minicolunas. Na detecção por CLAE foi observada eficiência na eluição das tetraciclina utilizando-se como fase móvel o ácido oxálico 0,01M:metanol:acetonitrila, 70:8:22 (v/v/v), em condição isocrática, com fluxo de 1mL/minuto e tempo total

de desenvolvimento de 11 minutos. Nestas condições, foram observados melhor resolução dos picos [12,38] e menores tempos de retenção do que os obtidos na condição gradiente, originalmente proposta por CARSON [6] e AOAC [1], como demonstrado na Tabela 2.

WHITE, MOATS & KOTULA [39] utilizaram, na separação dos antimicrobianos em estudo, uma condição gradiente contendo tampão de oxalato 0,05M, decanossulfonato 0,005M e acetonitrila. No entanto, apesar da boa separação observada, um tempo total de desenvolvimento de 25 minutos foi necessário para a eluição das tetraciclinas. MOATS [26] utilizou uma condição isocrática para esse método, obtendo um tempo de desenvolvimento de 14 minutos.

Para oxitetraciclina e clortetraciclina não houve diferença significativa entre os resultados de integração por área e altura dos picos nos cromatogramas ($p > 0,05$). No entanto, para tetraciclina, quando se utilizou o parâmetro altura, a recuperação média foi superior à observada para a área ($p < 0,05$) (Tabela 3). Foi realizada, também, a comparação entre os coeficientes de variação da área e da altura dos picos nos cromatogramas para a menor concentração quantificada neste experimento. Os coeficientes de variação nessas concentrações foram de 30,9; 27,8 e 40,9% na integração pelo parâmetro área e de 15,9; 13,1 e 18,9% pelo parâmetro altura, para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente. Como a precisão alcançada com o parâmetro altura dos picos nos cromatogramas foi maior, este parâmetro foi adotado na quantificação dos antimicrobianos em estudo.

TABELA 3. Comparação dos valores médios das recuperações na integração por área e altura dos picos nos cromatogramas para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina

Concentração (ng/mL)	Oxitetraciclina		Tetraciclina		Clortetraciclina	
	Recuperação		Recuperação		Recuperação	
	Área (%)	Altura (%)	Área (%)	Altura (%)	Área (%)	Altura (%)
10	101,7	93,4	-	-	-	-
15	118,3	100,2	-	-	-	-
20	104,2	83,1	74,6	79,7	-	-
30	87,4	76,2	79,4	78,3	-	-
50	73,1	90,0	69,4	85,5	108,0	86,2
75	71,4	89,2	80,0	89,8	80,9	84,9
100	89,0	90,8	83,2	89,3	82,8	82,9
150	93,2	98,3	89,7	104,9	87,2	92,4
200	76,3	82,7	81,4	84,9	88,8	81,7
Recuperação média (%)	90,5	89,3	79,7	87,5	89,5	85,6
Desvio padrão	15,7	7,68	6,42	8,83	10,8	4,17
T (teste emparelhado)	0,249		-3,298		0,790	
probabilidade	0,810		0,020		0,470	

3.2 – Validação do método otimizado

Foi observada linearidade da resposta na faixa de 10 a 200ng/mL para oxitetraciclina, de 10 a 200ng/mL para tetraciclina e de 30 a 250ng/mL para clortetraciclina. Foram obtidos coeficientes de determinação satisfatórios, significância da regressão ($p < 0,001$) e distribuição adequada dos desvios da regressão, não sendo observado desvio de linearidade ($p > 0,05$). Curvas típicas de linearidade estão apresentadas na Figura 1. Os limites de detecção do equipamento para os 150µL injetados foram de 1,5; 0,75 e 4,5ng para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente.

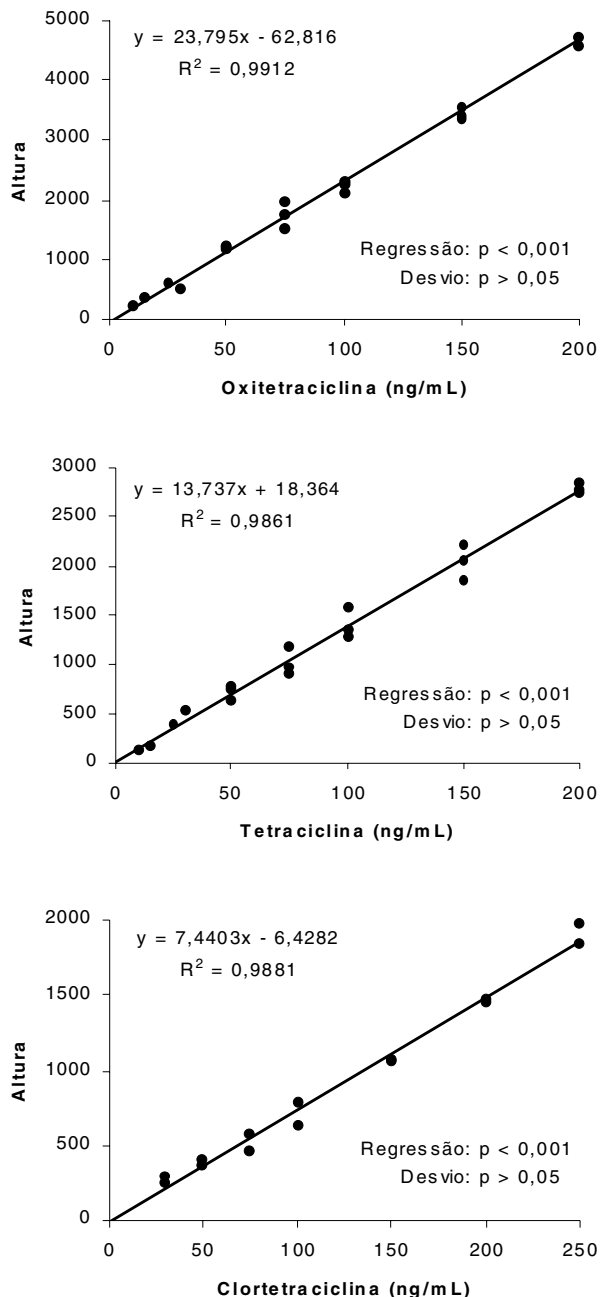


FIGURA 1. Linearidade da resposta para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina.

Na *Figura 2* estão representados cromatogramas dos brancos de amostras, soluções padrão de trabalho de 100ng/mL e amostras adicionadas com 100ng/mL. A seletividade do método foi demonstrada pela separa-

ção completa das tetraciclinas dos interferentes da matriz, pela resolução dos picos, pela recuperação satisfatória e semelhança (altura e simetria) entre os picos dos padrões e das amostras adicionadas.

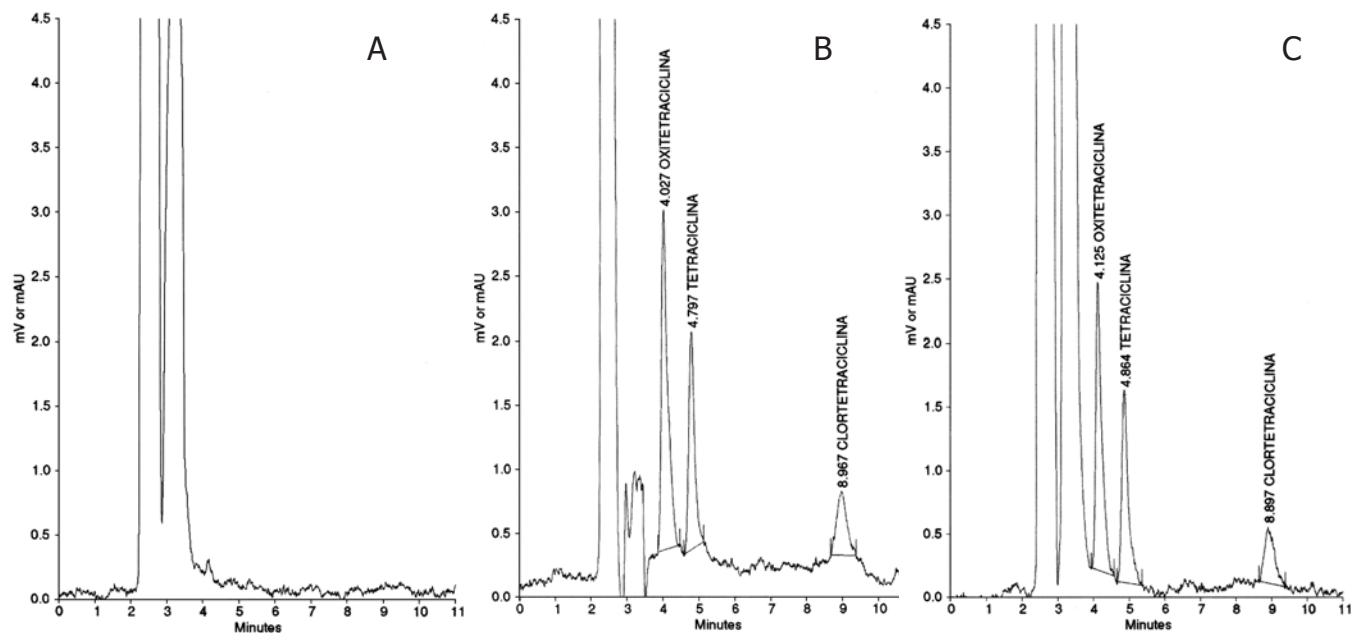


FIGURA 2. Cromatogramas típicos de branco de amostra (A), solução padrão de trabalho de 100ng/mL das tetraciclinas (B) e amostra adicionada de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em 100ng/mL (C).

As recuperações médias obtidas nos intervalos de concentração de 10 a 200ng/mL para oxitetraciclina, de 20 a 200ng/mL para tetraciclina e de 50 a 200ng/mL para clortetraciclina encontram-se apresentadas na *Tabela 3*. Os coeficientes de variação obtidos para esses analitos nas concentrações estudadas situaram-se na faixa de 1,4 a 16,3%; 3,4 a 13,1%; e 3,5 a 18,9%, respectivamente. As recuperações médias e coeficientes de variação encontraram-se dentro do estabelecido como aceitável (*Tabela 1*), demonstrando exatidão e precisão do método [8, 18].

Para oxitetraciclina foi determinado como nível de quantificação e detecção a concentração de 10ng/mL, avaliada em dez replicatas. A média de recuperação e o coeficiente de variação foram de 93,2 e 16,0%, respectivamente. Foi ainda estudada a concentração de 5ng/mL em cinco replicatas, sendo que apenas em duas replicatas foram detectados traços do composto. Portanto, para a oxitetraciclina os limites de detecção e de quantificação foram coincidentes, contemplando os valores de referência descritos na *Tabela 1*.

Para a tetraciclina os níveis de concentração de 15 e 20ng/mL foram estabelecidos como limite de detecção e de quantificação, respectivamente, avaliadas dez replicatas para cada concentração. A média de recuperação e o coeficiente de variação para a concentração de 20ng/mL foram de 79,7% e 13,1%, respectivamente, contemplando os valores descritos na *Tabela 1*. Para a concentração de 15ng/mL foi detectado o analito

em todas as replicatas, mas a média de recuperação e o coeficiente de variação foram de 74,8 e 42,1%, respectivamente. Portanto, esse valor foi considerado o limite de detecção para tetraciclina. Amostras com 10ng/mL também foram avaliadas, porém, o analito não foi detectado em nenhuma das replicatas.

Para a clortetraciclina concentrações de 40 e 50ng/mL foram estudadas em dez replicatas. Amostras com 50ng/mL apresentaram porcentagem média de recuperação e coeficiente de variação de 86,2 e 18,9%, respectivamente. Estes valores encontraram-se dentro das faixas recomendadas (*Tabela 1*), sendo, portanto, considerado o limite de quantificação para clortetraciclina. A concentração de 40ng/mL, embora detectada em todas as replicatas, apresentou porcentagem média de recuperação de 108,2% e coeficiente de variação de 24,4%. Como o coeficiente de variação foi superior a 20%, valor recomendado para quantificação (*Tabela 1*), esta concentração foi considerada o limite de detecção para clortetraciclina. Amostras com 30ng/mL também foram analisadas em 5 replicatas, mas somente em duas amostras o analito foi detectado.

Os coeficientes de variação situaram-se na faixa de 1,4 a 16,3% para oxitetraciclina, de 3,4 a 42,1% para tetraciclina e de 3,5 a 24,4% para clortetraciclina, nas faixas de concentração estudadas, incluindo os limites de detecção. A dispersão dos resultados individuais de porcentagem de recuperação neste intervalo de concentração encontra-se ilustrada na *Figura 3*. Na faixa quan-

tificável para cada tetraciclina, os resultados de porcentagem de recuperação das replicatas concentraram-se dentro dos limites recomendados de 70 a 110% [8,22], demonstrando a eficiência do método otimizado em recuperar os analitos na matriz do leite.

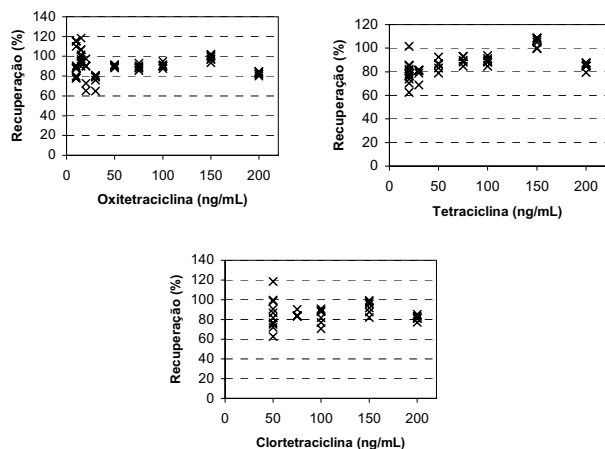
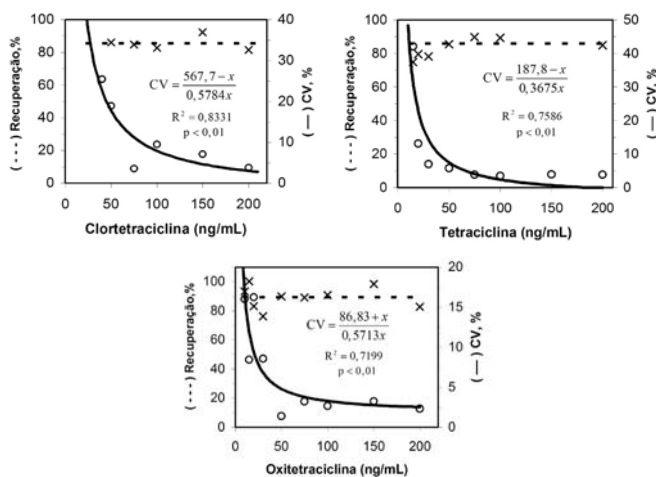


FIGURA 3. Dispersão dos resultados individuais de porcentagem de recuperação no intervalo de concentração que inclui o limite de detecção do método para cada tetraciclina estudada.



x = recuperação média
o = coeficiente de variação

FIGURA 4. Efeito da concentração das tetraciclina sobre as porcentagens médias de recuperação e os coeficientes de variação.

O efeito da concentração das tetraciclina sobre as médias de recuperação e os coeficientes de variação está representado na *Figura 4*. As médias de recuperação não foram influenciadas pela variação da concentração de tetraciclina na faixa estudada ($p > 0,05$). A tendência observada de redução do coeficiente de variação com o aumento da concentração das tetraciclina foi representada, empiricamente, por uma função inversa (Equação 1). A equação proposta por HORWITZ [16], $CV = 2^{(1-0,51 \log_{10} x)}$, não se ajustou aos dados experimentais, provavelmente devido às concentrações dos

resíduos estudados na ordem de ng/mL. THOMPSON [37] verificou que, para concentrações de analitos nesta faixa, a equação de HORWITZ [16] pode não ser apropriada. Por outro lado, a regressão linear aplicada à Equação 2 foi significativa ($p < 0,01$), fornecendo coeficientes de determinação de 0,7199; 0,7586 e 0,8331 para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente. Com base nas equações ajustadas e adotando o coeficiente de variação de 20%, recomendado pelo CODEX ALIMENTARIUS [8], pôde-se estimar o limite de quantificação do método de 8,3ng/mL para oxitetraciclina, 22,5ng/mL para tetraciclina e 45,2ng/mL para clortetraciclina, valores próximos aos limites 10; 20 e 50ng/mL, respectivamente, determinados experimentalmente. Estes resultados demonstraram o potencial aplicativo da função utilizada para descrever a variação do CV, com a concentração dos analitos, na predição de limites de quantificação do método, a serem comprovados experimentalmente.

4 – CONCLUSÕES

O método validado apresentou linearidade na faixa de 10 a 200ng/mL para a oxitetraciclina, de 10 a 200ng/mL para a tetraciclina e de 30 a 250ng/mL para a clortetraciclina.

A seletividade foi evidenciada pela completa separação das tetraciclina dos interferentes da matriz, pela resolução dos picos e pela recuperação satisfatória.

Exatidão e precisão foram observadas na faixa de 10 a 200ng/mL para a oxitetraciclina, de 20 a 200ng/mL para a tetraciclina e de 50 a 200ng/mL para a clortetraciclina.

Os limites de detecção de 10; 15 e 40ng/mL e de quantificação de 10; 20 e 50ng/mL determinados para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente, contemplaram os limites máximos de resíduos permitidos pela legislação brasileira e internacional.

O método demonstrou eficiência para ser utilizado nas atividades de monitoramento de resíduos de tetraciclina em leite pelo PNCRB do MAPA.

A função utilizada para representar a tendência de aumento do coeficiente de variação, com a redução da concentração dos analitos estudados, permitiu estimar limites de quantificação das tetraciclina, obtendo-se valores semelhantes aos alcançados experimentalmente.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]AOAC INTERNATIONAL – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17.ed. Maryland: AOAC, 2000. Mét. 33.262.
[2]BOISON, J.O.; KENG, L.J.Y. Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 81, n. 6, p.1113-1120, 1998.

- [3]BOISON, J.O.; KENG, L.J.Y.; MCNEIL, J.D. Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 77, n. 3, p.565-570, 1994.
- [4]BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n. 42 de 20 de dez. de 1999. Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 22 dez. 1999, p. 213-227
- [5]BRITO, M.A.V.P. Resíduos de antimicrobianos no leite. *Circular Técnica Embrapa Gado de Leite*, n. 60, 2000. 20 p.
- [6]CARSON, M.C. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using chelate affinity chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 76, n. 2, p. 329-334, 1993.
- [7]CHEN,C.L.; GU, X. Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum, and urine by capillary electrophoresis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 78, p.1369-1377, 1995.
- [8]CODEX ALIMENTARIUS. **Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos**. 2ed., v. 3, Roma: Codex Alimentarius, 1993.
- [9]CORPET, D.E. Microbiological hazards for humans of antimicrobial growth promoter use in animal production. **Revue Méd. Vét.** v.147, p851-822, 1996.
- [10]DAYAN, A.D. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. **Vet. Microbiol.** v. 35, p213-226, 1993.
- [11]EP – EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3 ed. Strasburg: Council of Europe, 1997. 1799p.
- [12]EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**. A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington, 1998. 61 p.
- [13]FAURE, O. Detection des antibiotiques: vers l'évolution de la method officielle. **Rev. Fr. Lab.**, n. 578, p. 28-30, 1998.
- [14]FLETOURIS, D.J.; PSOMAS, J.E.; MANTIS, A.J. Determination of some monobasic penicillins in milk by ion-pair liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p.617-721, 1992.
- [15]GOLDING, S.; MATTHEWS, K.R. Intrinsic mechanism decreases susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to multiple antibiotics. **J. Food Prot.**, v. 67, n. 1, p. 34-39, 2004.
- [16]HORWITZ, W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 63, p. 1344-1355, 1980.
- [17]LONG, A.R.; HSIEH, L.C.; MALBROUGH, M.S.; SHORT, C.R.; BARKER, S.A. Matrix solid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 73, n. 3, 1990.
- [18]LOUGH, W.J.; WAINER, I.W (Ed.) **High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice**. London: Black Academic & Professional, 1996. 276 p.
- [19]MARTIN, B.S.; MORAGA, R. Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus subtilis* BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. **Av. Cienc. Vet.**, v. 11, p. 43-48, 1996.
- [20]MCEVOY, J.D.G.; MAYNE, C.S.; HIGGINS, H.C.; KENNEDY, D.G. Transfer of chlortetracycline from contaminated feeding stuff to cows milk. **Vet. Rec.**, v. 22, p. 102-106, 2000.
- [21]MCINTOSH, C.; SHELDON, M. The new Delvotest SP: what are the implications for dry cow therapy? **Cattle Pract.**, v. 10, p. 119-123, 2002.
- [22]MERCOSUL – MERCADO COMUM DO CONE SUL. Resolução n. 57 de 1994. Critérios para a validação de metodologias analíticas para determinação de resíduos de princípios ativos de medicamentos veterinários (RMV) em produtos de origem animal, [s.n.l.],1994.
- [23]MINEO, H.; KANEKO, S. An analytical study of antibacterial residues in meat: the simultaneous determination of 23 antibiotics and 13 drugs using gas chromatography. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 34, n. 5, 1992.
- [24]MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A. Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 6, p. 742-745, 1998.
- [25]MOATS, W. A.; HARIK-KHAN, R. Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 931-934, 1995.
- [26]MOATS, W.A. Advances in determination of antibiotic residues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 80, p. 1-4, 1997.
- [27]MOATS, W.A.; ANDERSON, K.L.; RUSHING, J.E.; WESEN, D.P. Comparison of a radioimmunoassay (Charm II) test with high-performance liquid chromatography for detection of oxytetracycline residues in milk samples from lactating cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, n. 6, p. 795-800, 1995.
- [28]NEUBAUER, G.D. Antibiotic residues: perception vs reality. **Bov. Pract.**, v.32, n. 1, p. 45-47, 1998.
- [29]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. Int.**, v. 77, n. 4, p. 891-894, 1994.
- [30]PETZ, M. Residue analysis for antibiotics. **Meat Focus Int.**, v. 5, n. 10, p. 352-353, 1996.
- [31]PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477p.
- [32]RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1991. 596 p.
- [33]SNEDECOR G.W.; COCHRAN W.G. **Statistical methos**. 8 ed. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- [34]SOUZA, S.V.C.; BRITO, R.B. Validação de métodos: aplicação em análises de resíduos em alimentos. In: ENCONTRO PARA A QUALIDADE DE LABORATÓRIOS, 2002, São Paulo. **Anais...** São Paulo: REMESP. p. 15-21, 2002.
- [35]SWEENEY, D.J.; COLEMAN, M.R. Determination of apramycin in swine kidney tissue by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.**, v. 81, n. 6, p. 1141-1145, 1998.
- [36]THACKER, J.D.; CASALE, E.S.; TUCKER, C.M. Imunoassays (ELISA) for rapid, quantitative analysis in the food-processing industry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p.2680-2685, 1996.
- [37]THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, v.125, p. 385-386, 2000.
- [38]USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 27 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. 3013p.
- [39]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. Int.**, v. 76, n. 3, p. 549-555, 1993.