

## Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: uma revisão

### Analytical methodology for determination of tetracyclines residues in milk: a review

RIALA6/1397

---

Carolina Kato PRADO, Miguel MACHINSKI JUNIOR\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790. Zona 07. CEP 87020-900. Maringá, PR, Brasil. e-mail: mmjunior@uem.br  
Recebido: 03.05.2011 - Aceito para publicação: 09.11.2011

---

#### RESUMO

As tetraciclinas são um grupo de antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em gado leiteiro no Brasil, porém, o uso incorreto e o não cumprimento do período de carência podem resultar em resíduos destes medicamentos no leite. A presença de resíduos no leite pode causar o desenvolvimento de reações alérgicas nos consumidores desses produtos, resistência em bactérias e prejuízos na produção de produtos lácteos fermentados. Com a finalidade de fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de tetraciclinas em leite, foi realizada uma revisão das metodologias analíticas relatadas na literatura científica. Neste estudo foram abordadas as metodologias cromatográficas e de eletroforese capilar, que são comumente utilizadas.

**Palavras-chave.** tetraciclinas, cromatografia, eletroforese capilar, leite.

#### ABSTRACT

Tetracyclines are a group of antimicrobial drugs widely used in the treatment and prevention of infectious diseases in dairy cattle in Brazil. Intervals between tetracyclines administration and the withdrawal period should be complied with, in order to avoid the drug residues in milk. Milk containing antimicrobial residues might cause allergic reactions, occurrence of resistant bacteria and losses in manufacturing fermented dairy products. The present paper reviews the analytical methodology currently described in the literature for the determination of tetracyclines in milk. This study reviewed the chromatographic and the capillary electrophoresis, which have been the widely utilized methods.

**Keywords.** tetracyclines, chromatography, capillary electrophoresis, milk.

## INTRODUÇÃO

As tetraciclina são uma classe de antibióticos que agem contra uma grande variedade de microrganismos, desde bactérias gram-positivas até gram-negativas, sendo utilizadas na medicina veterinária, no tratamento e profilaxia de infecções<sup>1</sup>. A primeira tetraciclina descoberta foi a clortetraciclina a partir do *Streptomyces aureofaciens*, em 1948<sup>2</sup>. Existem oito tetraciclina comercializadas atualmente, sendo quatro mais comumente utilizadas em tratamentos de animais destinados à alimentação humana: oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina<sup>3</sup> (Figura 1).

O uso de antimicrobianos em vacas pode levar à presença de resíduos no leite, podendo causar reações alérgicas em consumidores<sup>4</sup>, induzir resistência em bactérias ou ainda, afetar o desenvolvimento de culturas utilizadas na obtenção de produtos fermentados<sup>5</sup>. Desse modo, é importante que se identifique os níveis desses resíduos no leite para mantê-los dentro dos limites recomendados e controlar a qualidade de produtos lácteos<sup>6</sup>. Para tanto, testes de inibição microbiológica têm sido usados para a triagem de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, porém, não são capazes de identificá-los e quantificá-los, assim como os testes imunológicos (ELISA e outros) que apresentam resultados falso-positivos ou falso-negativos, sendo necessárias ferramentas analíticas específicas<sup>7</sup>.

As etapas envolvidas no procedimento analítico para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite compreendem: extração; limpeza; identificação/quantificação; e confirmação. A presente revisão apresenta informações sobre a metodologia analítica para a determinação de resíduos de tetraciclina no leite. Tais métodos são necessários para a fiscalização, monitoramento e pesquisa nos seus vários aspectos, como análise de alimentos, estudos epidemiológicos,

verificação da estabilidade durante o processamento de alimentos e condições para descontaminação.

### Extração de tetraciclina da matriz leite

A extração consiste em um dos principais problemas na determinação de resíduos de antibióticos em leite, pois essa matriz contém altos teores de proteínas e lipídios, que podem interferir na análise dos resíduos<sup>8</sup>. Logo, para resolver esse problema, têm-se realizado uma desproteinização utilizando-se ácidos, como o ácido tricloroacético<sup>7,9</sup>, ácido acético e metanol<sup>10</sup>, ácido oxálico e acetonitrila<sup>11</sup>, ácido perclórico<sup>12</sup>, seguida de centrifugação. A retirada de gordura de amostras de leite pode ser realizada com pipetas de Pasteur ou centrifugação, congelando-se as amostras e em seguida descongelando-as, à temperatura ambiente ou em banho de água com agitação à aproximadamente 50 °C<sup>13</sup>. A presença de gordura em leite pode obstruir a coluna de extração da fase sólida utilizada na etapa de limpeza, aumentando o tempo deste processo<sup>14</sup>. A Tabela 1 apresenta a evolução dos principais métodos de extração, limpeza e identificação/quantificação de resíduos de tetraciclina em leite.

Samanidou et al.<sup>15</sup>, para otimizar a extração de tetraciclina no leite, testaram ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, acetona e acetonitrila como agentes desproteinizantes e verificaram que os dois primeiros tiveram melhores resultados na recuperação dos analitos em amostras adicionadas.

As tetraciclina são solúveis em ácidos, bases, alcoóis e solventes orgânicos polares, sendo extraídas com solventes orgânicos como n-butanol, acetato de etila, acetona e acetonitrila<sup>3</sup>. Andersen et al.<sup>16</sup> ao trabalharem com determinação de resíduos de tetraciclina em amostras de leite e camarão utilizaram como solvente da etapa de extração do leite o ácido succínico, obtendo bons resultados de recuperação para

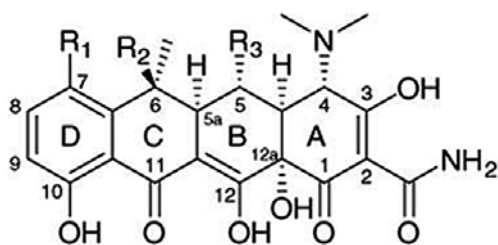


Figura 1. Estrutura química das tetraciclina

Tetraciclina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Oxitetraciclina	H	OH	OH
Tetraciclina	H	OH	H
Clortetraciclina	Cl	OH	H
Doxiciclina	H	H	OH

**Tabela 1.** Levantamento dos principais métodos analíticos para determinação de resíduos de tetraciclina em leite

Tetraciclina	Extração	Limpeza	Equipamento	Fase móvel	Coluna	Detector	Limite de Detecção (ng/ml)	Limite de quantificação (ng/ml)	Recuperação (%)	Referência
OTC, TC, CTC, DC	TCA 10% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-MeOH-ACN (60:25:15)	C8 (5µm; 250 x 4,6mm)	DAD (365nm)	-	-	80,3 – 93,3	19
OTC, TC, CTC, DC	-	C8	HPLC	ACN-ác. acético 7% (35:65)	C8 (5µm; 250 x 4,6mm)	DAD (267 e 361nm)	-	-	80,8 – 95,5	21
OTC, TC, CTC	Tampão succinato de sódio	Resina de Sepharose	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN-MeOH (72:20:8)	C18 (5 µm; 150 x 4,6mm)	UV-VIS (355nm)	10 – 40	10 – 50	79,7 – 90,5	13
OTC, TC, CTC	Ácido succínico	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN-MeOH (75:18:7)	C8 (5 µm; 150 x 4,6mm)	UV-VIS (370nm)	-	50	79,8 – 87,7	16
MNC, OTC, TC, CTC, DMC, DC, MTC, 4-EOTC, 4-ETC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	MeOH-Ác. trifluoroacético 0,01 M	C8 (5 µm; 150 x 2,1mm)	ESI-MS	1,5-10	50	74,4 – 101	34
OTC, TC, CTC, DC, 4-EOTC, 4-ETC	TCA 20%	C18	HPLC	Fase A: 1% de ác.fórmico.Fase B: MeOH-ACN (70:30)	C18 (3µm; 150 x 2,1mm)	MS	5 – 25	7,1 – 29,4	93,5 – 99,0	9
TC, OTC, 4-ETC	Tampão McIlvaine/ EDTA	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN-MeOH (150:20:20)	C18 (5 µm; 250 x 4,6mm)	DAD (365 e 280 nm)	2	-	71,5 – 91,5	14
MNC, TC, OTC, MTC, DMC, CTC, DC	Tampão oxalato e TCA 20%	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN	C18 (5 µm; 250 x 4mm)	DAD (355 nm)	-	-	93,8 – 107,2	15
CTC, OTC, TC	TCA 20% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: Ác. oxálico 0,01M em 5% ACN. Fase B: Ác. oxálico 0,01M em 95% ACN	C18 (3,5 µm; 150 x 2,1mm)	ESI-MS	0,5-3	-	72-106	25
OTC, DC, TC, CTC, ETC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	Ác. Oxálico 0,01 M- ACN	C8 (3,5 µm; 150 x 4,6mm)	FL (Em 500nm;Ex 385nm)	5,1 - 34,7	50	65-110	33
TC, OTC, CTC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	Tris, ác.fórmico, MeOH, ACN	C18	DAD (268nm)	7,14 - 14,9	-	89,83 – 105,2	36

OTC, TC, CTC, DC	Tampão McIl-vaine	C8	HPLC	Ác. Oxálico 0,01 M - ACN	C18 (5µm; 250 x 4,6 mm)	FL	3 - 15	-	50 - 90	18
OTC, DC, CTC, DMC, TC, MTC, 4-EOTC, 4-ETC, 4-EAC-TC, 4-ECTC, ACTC, ICTC, α-AOTC, β-AOTC, ATC, 4-EATC	Ác. oxálico 0,01 M em ACN	C18	HPLC	Fase A: Água. Fase B: ACN. Fase C: MeOH	C18 (3µm; 100 x 2mm)	MS	0,28 - 3,7	0,95 - 12,2	>88,6	11
OTC, TC, CTC, DC, EOTC, ETC, ECTC	TCA 20% e tampão McIl-vaine	C18	HPLC	Fase A: ác. Fórmico 0,2%. Fase B: ACN em 0,2% de ác. fórmico	C18 (3 µm; 150 x 2,1mm)	MS	-	-	94 - 103	17
TC, CTC, OTC.	TCA 30% em MeOH e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: cloreto de cálcio 0,075 M, acetato de sódio 0,035 M e EDTA. Fase B: MeOH-ACN (75:25)	DAD (385nm)	DAD (385nm)	20	60	83 - 107	20
TC, OTC, DC	Tampão McIl-vaine	C18	CE	Ác. cítrico 20nmol/L e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40nmol/L	Capilar de sílica fundida (64,5 x 75 µm)	DAD (295nm)	0,5 - 1	1 - 2	81,8 - 99,1	22
TC, CTC, DC, OTC, MTC	TCA 20%	C18	HPLC	ACN-ác. oxálico 0,01 M	C18 (1,7 µm; 50 x 2,1mm)	DAD (380, 268, 229nm)	0,004 - 0,022	0,02-0,08	55,2 - 92	26
OTC, DC, TC, CTC	Ác. Perclórico	-	HPLC	Ác. oxálico 0,010 M - ACN	C18 (5 µm; 150 x 4,6mm)	DAD (360nm)	7,9 - 35,3	-	98,2 - 102,9	28
OTC, DC, TC, CTC	ACN e Sulfato de magnésio,	-	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M - ACN	C18 (5 µm; 150 x 4,5mm)	DAD (360nm)	0,13 - 0,51	-	95,9 - 104,6	12
TC	TCA	C18	CE	NaOH 0,01 M eborato 0,02 M	Capilar de sílica fundida	DAD (200nm)	0,24	0,72	-	35

OTC = oxitetraciclina; TC = tetraciclina; CTC = clortetraciclina; DC = doxiciclina; MNC = minociclina; DMC = demeclociclina; MTC = metaciclina; 4-EOTC = 4-epi-oxitetraciclina; 4-ETC = 4-epi-tetraciclina; 4-ECTC = 4-epi-clortetraciclina; 4-EACTC = 4-epianidrotetraciclina; ACTC = anidrotetraciclina; ICTC = isodortetraciclina; α-AOTC = α-epi-oxitetraciclina; β-AOTC = β-epi-oxitetraciclina; ATC = anidrotetraciclina; 4-EATC = 4-epianidrotetraciclina; EOTC = epioxitetraciclina; ETC = epitetraclina; ECTC = epiclortetraciclina; TCA = ácido tricloroacético; HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência, CE = Eletroforese capilar; MeOH = metanol, ACN = acetonitrila; NaOH = hidróxido de sódio; DAD = detector de arranjo de diodos; MS = espectrometria de massas; ESJ = Ionização por eletrospray; FL = fluorescência; µm = micrômetro; mm = milímetro; ng = nanograma; ml = mililitro; nm = nanômetro; M = mol/l.

Referências apresentadas em ordem cronológica.

oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina (86; 87,7 e 79,8%, respectivamente).

Muitos estudos<sup>6,14,17-20</sup> têm utilizado a solução tampão McIlvaine para extrair tetraciclina de amostras de leite. Alguns autores<sup>6,14,18,21</sup> afirmam que esse tampão reduz a complexação das tetraciclina com íons metálicos e com grupos silanóis. A solução tampão é composta por 0,07 M ácido cítrico monohidratado, 0,1 M hidrogenofosfato dissódico dihidratado, 0,01 M ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) diluídos em um litro de água e o pH é ajustado para faixa desejada, com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio<sup>6</sup>. As tetraciclina são facilmente destruídas em soluções alcalinas, por isso, justifica-se ajustar o pH da solução tampão para ácido<sup>22</sup>.

Chico et al.<sup>18</sup> testaram o efeito do pH e a da concentração de EDTA na solução tampão McIlvaine e verificaram que ao diminuir o pH de 5,0 para 3,5 ocorre um aumento das taxas de recuperação e reprodutibilidade, porém em pH muito baixo pode ocorrer a precipitação do EDTA na solução. As concentrações de EDTA afetam de forma drástica a recuperação de tetraciclina e oxitetraciclina, verificando-se que a taxa de recuperação de oxitetraciclina aumentou de 20 para 60% quando a concentração de EDTA foi de 0,01 para 0,1 mol/l. Entretanto, altas concentrações desse ácido podem causar problemas de solubilidade.

A procura por procedimentos de extração que utilizem pouco ou nenhum reagente tóxico levou Furusawa<sup>21</sup> a desenvolver um método de separação de tetraciclina do leite bovino, diluindo suas amostras em água à concentração de cinco vezes e passando por coluna de extração de fase sólida diretamente, resultando em amostras livres de compostos interferentes e sem necessidade da etapa de purificação. Essa metodologia permitiu taxas de recuperação maiores de 80% com desvios padrões variando de 1,3 a 4,8.

### **Etapas de limpeza de extratos para tetraciclina**

Para reduzir interferentes e proteínas, e selecionar a concentração de analitos de interesse, é necessário que os extratos passem por uma etapa de limpeza antes da determinação de tetraciclina<sup>15,23</sup>. Essa etapa é de extrema importância, pois influencia na reprodutibilidade e nas taxas de recuperação<sup>24</sup>.

As técnicas mais utilizadas para purificação de antibióticos são extração líquido-líquido e extração por colunas de fase sólida, porém a segunda tem recebido maior atenção por realizar extração e purificação,

simultaneamente, em matrizes biológicas devido a sua simplicidade, curto tempo de operação e utilização de quantidades menores de solventes orgânicos<sup>25</sup>.

Tsai et al.<sup>12</sup> trabalharam com extração líquido-líquido com partição induzida por sal (*salting-out*) utilizando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaCl e em seguida fizeram uma co-precipitação com hidróxido de magnésio, ajustando com água deionizada ao volume de 200 µl e filtrando em membrana de 0,45 µm, podendo ser diretamente injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

Wang e Li<sup>26</sup> determinaram simultaneamente 10 resíduos de antimicrobianos em leite e avaliaram diversas colunas comerciais na etapa de purificação. As colunas foram pré-lavadas com 5 ml de metanol e 5 ml de água ultra pura. A coluna empacotada com partículas C-8 (ENVI-8) resultou em menores recuperações de oxitetraciclina e tetraciclina do que as colunas do tipo C-18, tendo a coluna HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) apresentado as melhores taxas de recuperação (acima de 80%) para todos os 10 antibióticos avaliados. Nesse mesmo trabalho, os autores testaram quatro reagentes de eluição (metanol e ácido oxálico em metanol nas concentrações de 5, 10, 15 mmol/l) e verificaram que todos resultaram em uma eficiência maior que 80,1%, sendo escolhido para o estudo 4 ml de metanol, não sendo necessária acidificação como recomendado por Gentili et al.<sup>27</sup>.

No entanto, Tong et al.<sup>22</sup> não conseguiram boa recuperação ao eluir as amostras da coluna de extração fase sólida com metanol, pois houve eluição de interferentes da matriz. Para corrigir este problema, diferentes proporções de metanol-água foram testadas, verificando-se que quanto maior a concentração de água, menos interferentes eram eluídos, porém altas concentrações de água dificultam o processo de concentração sob fluxo de nitrogênio. Desse modo, os autores testaram misturas de acetona e diclorometano como solvente de eluição e concluíram que acetona-diclorometano na proporção de 4:6 (v/v) resulta em boa recuperação para tetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina, eliminando as substâncias interferentes.

### **Identificação/quantificação de tetraciclina**

A detecção e quantificação de resíduos de tetraciclina em amostras de leite são realizadas principalmente por técnicas cromatográficas e eletroforese capilar. Dentre as mais utilizadas estão a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção

por absorção no ultravioleta (UV)<sup>19,21</sup> ou por arranjo de diodos<sup>28</sup>. A cromatografia gasosa, apesar de possuir alta resolução, necessita de uma etapa de derivação para determinação de antibióticos, por serem polares, não volatilizando suficientemente ou por serem termicamente instáveis<sup>29</sup>.

### **Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência**

Husain et al.<sup>30</sup> estudaram o comportamento cromatográfico de antibióticos em camada delgada de troca iônica inorgânica, silicato de titânio, com fases móveis orgânica, aquosa e mistura aquosa e orgânica e concluíram que houve uma boa resolução dos antimicrobianos.

Segundo Toldrá e Reig<sup>31</sup>, as vantagens da cromatografia em camada delgada de alta eficiência para detecção de antibióticos são o grande número de amostras para um único analito a ser analisado, o tempo reduzido para obtenção de resultados, a possibilidade de automação, a sensibilidade do método, a especificidade (dependendo da técnica de detecção) e os analitos, que separados, podem ser recuperados para as análises confirmatórias. A visualização dos componentes pode ser feita por agente cromogênico ou luz UV. Com o uso de densitômetro é possível realizar uma análise quantitativa medindo-se a intensidade relativa da mancha na placa e comparando-se com um padrão.

Apesar de ser uma técnica eficiente para detectar resíduos de antibióticos, tem-se procurado por métodos que possibilitem a identificação e quantificação de forma mais direta e sensível.

### **Cromatografia líquida de alta eficiência**

As colunas analíticas tipicamente usadas na separação de tetraciclinas são as de fase reversa  $C_{18}$  ou  $C_8$ , sendo que, as mais comuns são empacotadas esféricas e irregulares, geralmente com “end-capping”<sup>32</sup>. As colunas de fase reversa com “end-capping” são utilizadas preferencialmente pela sua habilidade intrínseca de reduzir interações silanóis. As tetraciclinas, devido às suas duplas ligações, oxigênio e nitrogênio substituintes, reagem com silanóis e traços de metais presentes no material de empacotamento de sílica e podem produzir picos com cauda<sup>32</sup>.

As fases móveis mais utilizadas na eluição gradiente para tetraciclinas são compostas por 0,01 mol/l de ácido oxálico e acetonitrila<sup>33</sup> ou  $CaCl_2$ -acetato

de sódio- EDTA e metanol-acetonitrila (75:25, v/v)<sup>20</sup> ou água e mistura de metanol/acetonitrila<sup>9</sup>. Enquanto que, na eluição isocrática, podem ser utilizados ácido oxálico 0,01 M-acetonitrila-metanol em diferentes proporções<sup>13,14</sup>.

Zhenfeng et al.<sup>34</sup> utilizaram a coluna  $C_8$  para separação de 7 tetraciclinas e 3 produtos de biotransformação, com taxa de vazão de 0,3 ml/min com baixa pressão da coluna. Nesse estudo todas as tetraciclinas e seus produtos de biotransformação foram separados com o gradiente de metanol e solução aquosa de 0,01 M de ácido trifluoroacético.

As tetraciclinas apresentam forte absorção UV entre 270 e 360 nm em pH ácido e neutro, então o sistema de detecção mais comum é a absorção UV<sup>3</sup>. Porém, outros detectores acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência podem ser utilizados para determinação de resíduos de tetraciclinas, como o detector eletroquímico testado por Casella e Picerno<sup>6</sup>. Neste estudo, os autores testaram o detector amperométrico usando eletrodo de ouro policristalino operando sob condições de detecção amperométrica e detecção amperométrica pulsada, verificando que em condições amperométricas a 1,6 V a determinação de tetraciclinas em amostras de leite foi eficiente, enquanto que, a detecção amperométrica pulsada produziu uma linha base instável e larga na região cromatográfica próxima a do solvente e onde as tetraciclinas foram eluídas, podendo ser resultado da presença de interferentes de matriz com pronunciada atividade eletroquímica.

A determinação de multirresíduos (tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol) em leite bovino foi realizada por Mamani et al.<sup>20</sup> usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, em que os limites de detecção e quantificação achados foram 20 e 60 ng/ml, respectivamente para todos os antimicrobianos, concluiu-se que o método desenvolvido foi adequado para determinação de resíduo de antibióticos em leite e ainda pôde-se verificar que a estabilidade das tetraciclinas depende da estrutura química de cada uma, ou seja, a clortetraciclina sob condições de estresse alcalino foi a menos estável e a oxitetraciclina foi a menos estável ao ácido e oxidantes. Tsai et al.<sup>28</sup> também analisaram amostras de leite em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de diodos e encontraram limites de detecção entre 7,9 e 35,3 ng/g para quatro tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina).

A fluorescência das tetraciclina depende da sua forma molecular, logo, para aumentar a sensibilidade do método, é necessário fazer uma derivação pós-coluna baseada em complexação de metais. Para analisar tetraciclina em amostras de leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, Spisso et al.<sup>33</sup> utilizaram  $Mg^{2+}$  em solução de dimetilformaldeído (alcalino) e obtiveram o máximo de fluorescência quando utilizaram uma taxa de vazão de 0,6 ml/min. Nesse trabalho, os autores encontraram limites de detecção de 5,1; 9,7 e 34,7  $\mu g/kg$  para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente, e limites de quantificação de 50  $\mu g/kg$  para as três tetraciclina. Este método foi capaz de confirmar a presença de tetraciclina em amostras de leite.

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas por apresentar alta sensibilidade e possibilitar uma análise qualitativa e quantitativa eficiente, sendo possível ainda trabalhar com determinação simultânea de resíduos. Além disso, possibilita o uso do detector UV-Vis, não sendo necessário utilizar reagentes para derivação como no caso do detector de fluorescência. Assim, os detectores UV-Vis e de arranjo de diodos são mais utilizados em análises de resíduos de tetraciclina.

### **Eletroforese Capilar**

A eletroforese capilar é uma técnica analítica de separação muito utilizada por sua capacidade de determinação de diferentes analitos simultaneamente, apresentando alta eficiência e resolução<sup>35</sup>.

As principais vantagens da eletroforese capilar na determinação de resíduos de tetraciclina são simplicidade, rapidez, pouco consumo de solventes, pequena quantidade de amostra e baixa contaminação ambiental. Portanto, tem sido considerada uma alternativa efetiva ao método de CLAE, contudo, a eletroforese capilar acoplada ao arranjo de diodos é conhecida por apresentar baixa sensibilidade devido à limitada injeção de amostra e à pequena janela para detecção<sup>36</sup>.

Resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em leite bovino foram determinados pela primeira vez em eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massa por Wang et al.<sup>36</sup>. A sensibilidade desse método foi 30 vezes maior do que a resultante no método de eletroforese capilar acoplada ao arranjo de fotodiodos.

Vera-Candioti et al.<sup>35</sup>, analisando antibióticos em leite bovino cru em eletroforese capilar acoplada ao

detector de arranjo de diodos, concluíram que o método possui alta eficiência e tempo curto de análise (8 min), podendo ser utilizada para determinação de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite.

A determinação simultânea de seis resíduos de antibióticos, incluindo a tetraciclina, foi realizada por Santos et al.<sup>37</sup>. Nesse estudo, os autores compararam análises feitas em eletroforese capilar e CLAE, ambas acopladas ao detector UV-Vis, e concluíram que os resultados de recuperação foram semelhantes entre as duas técnicas, tendo obtido para tetraciclina a um nível de fortificação de 2,5  $\mu g/ml$  68,8% para CLAE e 66,1% para EC e a um nível de fortificação de 5,0  $\mu g/ml$  73,3% CLAE e 73,9% para EC. Ainda foi possível verificar qual dos dois métodos apresentaram boa repetibilidade e, embora a CLAE tenha apresentado menores limites de detecção e quantificação e, separação mais eficiente dos antibióticos, a EC utiliza menores volumes de solventes orgânicos, resultando em menor impacto ambiental.

Desse modo, verifica-se que o método por eletroforese capilar é econômico, traz menores prejuízos ao ambiente e pode ter bons resultados com uma simples troca de detector, apresentando resultados semelhantes à CLAE, que é uma das técnicas mais utilizadas para análise de resíduos de tetraciclina.

### **Confirmação da identidade das tetraciclina**

A etapa final da metodologia analítica é a confirmação da identidade das tetraciclina. A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência é um procedimento de confirmação altamente específico na análise de tetraciclina. Ruyck e Ridder<sup>9</sup> desenvolveram um método de determinação de tetraciclina em leite bovino utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com uma interface de ionização de elétrons, que detectou concentrações de resíduos entre 5 e 20  $\mu g/l$ .

### **Considerações finais**

A determinação de resíduos de antimicrobianos em leite é necessária por tratar de medicamentos amplamente utilizados na medicina veterinária no Brasil e que podem trazer prejuízos para a saúde do consumidor. Além dos prejuízos econômicos para o produtor e os fabricantes de produtos lácteos. Há muitos fatores limitantes na análise de tetraciclina em leite, portanto, todas as etapas merecem atenção e cuidado. Recuperações melhores têm sido obtidas com o uso do tampão McIlvaine e colunas de

fase sólida (C-18) nas etapas de extração e limpeza. Dentre as técnicas analíticas, a mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção por absorção no ultravioleta (UV) ou por arranjo de diodos, embora existam técnicas que apresentem bons resultados, porém, com menor sensibilidade como é o caso da eletroforese capilar, que ainda permite uma análise rápida e menos poluente. Muitos autores têm desenvolvido trabalhos para análise de tetraciclina em leite, porém, ainda há uma enorme busca e são necessárias melhorias para obtenção de metodologias rápidas, fáceis, acessíveis economicamente e ecologicamente corretas.

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

#### REFERÊNCIAS

1. Chopra I, Roberts M. Tetracyclines antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001; 65(2):232-60.
2. Duggar BM. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann New York Acad Sci*. 1948; 51:177-81.
3. Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A*. 2000; 882(2):109-33.
4. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Report Geneva; 1996. WHO-Food Additives Series 36;1996 [acesso 2010 Out 27]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>].
5. Cogan TM. Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotics. *Appl Microbiol*. 1972; 23(5):960-5.
6. Casella IG, Picerno F. Determination of tetracycline residues by liquid chromatography coupled with electrochemical detection and solid phase extraction. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(19):8735-41.
7. Bogianni S, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Laganà A, Nicolardi S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residue in bovine milk. *Food Chem*. 2008; 108:354-60.
8. Aguilera-Luiz MM, Vidal JLM, Romero-González R, Frenich AG. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008; 1205:10-6.
9. Ruyck HD, Ridder HD. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007; 21:1511-20.
10. Msagati TAM, Nindi MN. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*. 2004; 64:87-100.
11. Spisso BF, Araújo Junior MAG, Monteiro MA, Lima AMB, Pereira MU, Luiz RA, Nóbrega LAW. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 656:72-84.
12. Tsai WH, Huang TC, Chen HH, Huang JJ, Hsue MH, Chuang HY et al. Determination of tetracyclines in surface water and milk by the magnesium hydroxide coprecipitation method. *J Chromatogr A*. 2010; 1217:415-8.
13. Ruela ICA, Lima JA, Souza SVC, Junqueira RG. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1):139-46.
14. Fritz JW, Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chem*. 2007; 105:1297-301.
15. Samanidou VF, Nikolaidou KI, Papadoyannis IN. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J Sep Sci*. 2007; 30:2430-9.
16. Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP, Kuck LR. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 529:145-50.
17. Bohm DA, Stachel CS, Gowik P. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:8217-23.
18. Chico J, Meca S, Companyó R, Prat MD, Granados M. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography application to food and environmental analysis. *J Chromatogr A*. 2008; 1181:1-8.
19. Cinquina AL, 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. *J Chromatogr A*. 2003; 987:227-33.
20. Mamani MCV, Reyes FGR, Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem*. 2009; 117(3):545-52.
21. Furusawa N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. *Talanta*. 2003; 59:155-9.
22. Tong J, Rao Q, Zhu K, Jiang Z, Ding S. Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *J Sep Sci*. 2009; 32:4254-60.



23. Yang M, Xu Y, Wang JH. Lab-on-valve system integrating a chemiluminescent entity and in situ generation of nascent bromine as oxidant for chemiluminescent determination of tetracycline. *Anal Chem*. 2006; 78:5900-5.
24. Zhang Y, Lu S, Liu W, Zhao C, Xi R. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residue of tetracycline in milk. *J Agric Food Chem*. 2007; 55:211-8.
25. Koesukwiwat U, Jayanta S, Leepipatiboon N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. *J Chromatogr A*. 2007; 1149:102-11.
26. Wang L, Li YQ. Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC. *Chromatographia*. 2009; 70(1/2):253-8.
27. Gentili A, Perret D, Marchese S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal food products. *Trends Anal Chem*. 2005; 24:704-33.
28. Tsai WH, Huang TC, Huang JJ, Hsue YH, Chuang HY. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:2263-9.
29. Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Guerrero C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal Chem*. 2007;26(6):466-85.
30. Husain SW, Ghoulipour V, Sepahrian H. Chromatographic behaviour of antibiotics on thin layers of an inorganic ion-exchanger. *Acta Chromatographica*. 2004; 14:102-9.
31. Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Science & Technology*. 2006; 17:482-9.
32. Anderson CR, Rupp HS, Wu WH. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2005; 1075:23-32.
33. Spisso BF, Jesus ALO, Araújo Junior MAG, Monteiro MA. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 581:108-17.
34. Zhenfeng Y, Yueming Q, Xiuyun L, Caini J. Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Chin J Anal Chem*. 2006; 34(9):1255-9.
35. Vera-Candiotti L, Olivieri AC, Goicoechea HC. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta*. 2010; 82:213-21.
36. Wang S, Yang P, Cheng Y. Analysis of tetracycline residue in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking. *Electrophoresis*. 2007; 28:4173-9.
37. Santos SM, Henriques M, Duarte AC, Esteves VI. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta*. 2007; 71:731-7.