



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

JAFF RIBEIRO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DO ANTIBIÓTICO
CLORANFENICOL EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTÍCIAS

SALVADOR

2009

JAFF RIBEIRO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DO ANTIBIÓTICO
CLORANFENICOL EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTÍCIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Dr^a JANICE IZABEL DRUZIAN

SALVADOR

2009

**Dedico e agradeço aos meus pais, Maria e Juarez,
e aos meus irmãos, James e Jussara,
por todo exemplo, apoio e confiança
que sempre recebi.**

AGRADECIMENTOS

À Deus por todo alento e força dados nos momentos de dificuldades.

À minha orientadora, prof. Dr^a Janice I. Druzian, por toda confiança depositada, pelo conhecimento, pela amizade e incentivo que alavancaram meu crescimento profissional.

À Luciana Tosta por todo companheirismo e amizade que foram muito além de sua disposição nos intermináveis dias e noites de trabalho no LAPESCA. Lu sem você nada disso seria possível.

À Carolina Oliveira não somente pela ajuda nas noites e nos finais de semana de trabalho no LAPESCA, mas também por todo carinho e amizade.

À toda a equipe LAPESCA pela ajuda, sorrisos e apoio.

Aos professores do Departamento de Análises Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da UFBA pela fundamentação, pela ajuda profissional e por todo incentivo que foram essenciais para esta conquista.

Ao amigo Alvaro Teixeira pela confiança depositada em meu trabalho e pelo conhecimento compartilhado que foi determinante para sanar dificuldades.

Aos demais professores da Faculdade de Farmácia da UFBA, por seus conhecimentos terem sido de fundamental importância em certos momentos.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFBA por todo suporte.

À FAPESB pela concessão da bolsa de mestrado.

À equipe da Fazenda Oruabo da BAHIA PESCA S/A pela doação das amostras de camarão; e à equipe do Apiário do Campus II da Universidade Estadual da Bahia – UNEB pela doação das matrizes apícolas.

Aos colegas de mestrado pelo compartilhamento de dificuldades e alegrias durante toda essa jornada.

Aos amigos Margareth Ribeiro, Fábio Sanches, Fúlvio Viegas, Leonardo Maciel e Diego Rios pelos momentos de descontração e apoio quando a sobrecarga exigia um descanso.

A todos aqueles que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho, mesmo sendo com um simples “Olá...” ou um belo sorriso, que forneciam mais força para prosseguir meu trabalho.

Muito Obrigado!

Jaff Ribeiro da Silva

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser mas, graças a Deus, não somos o que éramos".

Martin Luther King

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura química do cloranfenicol (CAP).....22

CAPÍTULO II

Figura 1. Fluxograma do método inicialmente utilizado para a otimização das condições de extração, purificação, derivação e cromatográficas (Destaque: Parâmetros otimizados).....62

Figura 2. (A) CAP; **(B)** CAP Silanizado.....65

Figura 3. (A) Cromatograma CG/EM da solução padrão de 3 mg/mL do CAP obtido pela silanização com 100 µL de Sigma Sil-A (Destaque: CAP no Tr de 19,6 min); **(B)** Espectro de massas obtido do pico do CAP silanizado (Destaque: estrutura do CAP Bis-silanizado).....65

Figura 4. (A) Cromatograma CG/EM da solução padrão de 3 mg/mL do CAP obtido pela silanização com 500 µL de Sigma Sil-A (Destaque: CAP no Tr de 19,6 min); **(B)** Espectro de massas obtido do pico do CAP silanizado (Destaque: estrutura do CAP Bis-silanizado).....66

Figura 5. Cromatograma CG/DCE de CAP silanizado na concentração de 3 mg/mL..67

Figura 6. Cromatogramas obtidos por CG/DCE: **(A)** Cromatograma da solução CAP silanizado de 4 µg/mL; **(B)** Cromatograma da silanização em branco (sem adição de CAP).....68

Figura 7. Cromatogramas CG/DCE de CAP a 0,4 µg/L em diferentes condições: **(A)** CAP não liofilizado e silanizado por 2 h (não detectou CAP); **(B)** CAP liofilizado e silanizado por 2 h; **(C)** CAP liofilizado e silanizado durante 15 min.....70

Figura 8. Esquema simplificado de um injetor *split/splitless*.....71

Figura 9. Cromatogramas da solução de 5 µg/L de CAP liofilizado silanizado durante 15 min: (A) Injeção de 1 µL utilizando um <i>liner</i> de 4 mm de diâmetro interno; (B) Injeção de 1 µL utilizando um <i>liner</i> de 2 mm de diâmetro interno.....	72
Figura 10. Gráfico comparativo das áreas dos picos de CAP silanizado obtidas por CG/DCE utilizando modo de injeção <i>splitless</i> com <i>liners</i> de 2 e 4 mm.....	73
Figura 11. Cromatogramas da solução de 1 µg/L de CAP liofilizado silanizado durante 15 min: (A) Injeção de 1 µL com abertura da válvula <i>split</i> em 0,25 min; (B) Injeção de 1 µL com abertura da válvula <i>split</i> em 0,50 min; (C) Injeção de 1 µL com abertura da válvula <i>split</i> em 0,75 min.....	74
Figura 12. Gráfico comparativo das áreas dos picos de CAP silanizado obtidas por CG/DCE utilizando modo de injeção <i>splitless</i> com diferentes tempos para abertura da válvula <i>split</i>	74
Figura 13. Fluxograma do primeiro método utilizado para a determinação de resíduos de CAP na matriz camarão.....	79
Figura 14. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método descrito na figura 13: (A) Matriz camarão com a presença de co-eluyente; (B) Extração sem a adição de amostra mostrando que o co-eluyente é originado da matriz.....	80
Figura 15. Cromatogramas obtidos pelo CG/EM: (A) Solução padrão de 3 mg/mL do CAP silanizado (CAP no Tr de 13,5 min); (B) Extrato concentrado da matriz camarão, destacando presença de co-eluyente no Tr do CAP.....	81
Figura 16. Espectros de massa dos possíveis co-eluyentes do CAP para a matriz camarão: (A) Ácido Palmítico Clorídrico (C ₁₆ H ₃₁ ClO); (B) Ácido Láurico Clorídrico (C ₁₂ H ₂₃ ClO); (C) Miristoil Clorídrico (C ₁₄ H ₂₇ ClO).....	82
Figura 17. Fluxograma do primeiro método utilizado para determinação de resíduo de CAP nas matrizes mel e pólen.....	83
Figura 18. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método descrito na figura 17, ambos apresentam a presença de co-eluyentes: (A) Matriz mel; (B) Matriz Pólen.....	84
Figura 19. Esquema dos tipos de grupos silanóis normalmente encontrados na superfície da sílica gel.....	88

Figura 20. Fluxograma da etapa de purificação do método alterada (inclusão de lavagem com hexano e da purificação SPE C18).....	89
Figura 21. Cromatogramas CG/DCE do extrato da matriz camarão purificados por dois diferentes tipos de cartuchos SPE: (A) Purificação por SPE com Sílica Gel; (B) Purificação por SPE com C18.....	90
Figura 22. Cromatogramas CG/DCE: (A) Solução padrão de CAP silanizado de 15 µg/L; (B) Cromatograma da matriz camarão obtido pelo método de extração com inclusão de lavagem com hexano e da purificação SPE C18 (Figura 20).....	91
Figura 23. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método de extração com inclusão de lavagem com hexano e da purificação SPE C18 para as matizes apícolas (Figura 20): (A) Matriz mel; (B) Matriz Pólen.....	92
Figura 24. Cromatogramas CG/DCE utilizando 60 m de coluna DB1: (A) Solução padrão de CAP silanizado; (B) Matriz camarão.....	94
Figura 25. Cromatogramas CG/DCE utilizando 60 m de coluna DB1 e modificações na rampa de temperatura: (A) Solução padrão de CAP silanizado; (B) Matriz camarão.....	95
Figura 26. Fluxograma da etapa de purificação do método alterada (purificação por duas colunas SPE, respectivamente, C18 e sílica gel).....	97
Figura 27. Cromatogramas CG/DCE comparando métodos com etapas de purificação em duas condições diferentes para a matriz camarão: (A) Purificação por duas colunas SPE, respectivamente, C18 e sílica gel; (B) Purificação apenas por SPE C18.....	97
Figura 28. Fluxograma da etapa de purificação do método alterada (purificação por duas colunas SPE, respectivamente, sílica gel e C18).....	98
Figura 29. Cromatogramas CG/DCE comparando métodos com etapas de purificação em duas condições diferentes para a matriz camarão: (A) Purificação por duas colunas SPE, respectivamente, sílica gel e C18 ; (B) Purificação por duas colunas SPE, respectivamente, C18 e sílica gel	99

Figura 30. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método com purificação feita por duas colunas SPE, respectivamente, sílica gel e C18. **(A)** Matriz mel; **(B)** Matriz pólen.....100

Figura 31. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método com purificação feita por lavagens com hexano e SPE com C18, nas matrizes: **(A)** Matriz avestruz; **(B)** Matriz tilápia.....102

Figura 32. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método com purificação feita por lavagens com hexano e SPE com C18, nas matrizes: **(A)** Carne ovina; **(B) Carne caprina;** **(C)** Leite caprino.....103

Figura 33. Fluxograma do método completo otimizado para a determinação de resíduos de CAP em carnes caprina e ovina, e leite caprino.....105

CAPÍTULO III

Figura 1. Estrutura química do CAP.....113

Figura 2. Fluxograma dos procedimentos de extração, purificação e derivação de CAP de amostras de leite caprino.....118

Figura 3. Identificação do CAP silanizado por CG/EM: **(A)** Cromatograma da solução padrão CAP silanizado (3 mg/mL); **(B)** Espectro de massas obtido e estrutura do CAP Bis-silanizado.....123

Figura 4. Cromatogramas obtidos por CG/DCE da amostra leite de cabra: **(A)** Amostra fortificada com 1,50 µg/kg de CAP; **(B)** Amostra em branco; **(C)** Padrão de 1,25µg/kg de CAP silanizado.....124

Figura 5. Curva de calibração padrão externo de CAP silanizado (área x concentração em µg/kg) obtida por CG/DCE. $y = 5200,3x - 382,43$ e $R^2 = 0,9982$125

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Métodos cromatográficos utilizados na determinação de resíduos de CAP em diversas matrizes alimentícias.....39

CAPÍTULO II

Tabela 1. Parâmetros avaliados na otimização do *splitless*.....72

Tabela 2. Descrição das alterações na rampa de temperatura da coluna cromatográfica e seus respectivos resultados para a matriz mel.....86

Tabela 3. Descrição das alterações na rampa de temperatura da coluna cromatográfica e seus respectivos resultados para a matriz camarão.....87

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores de referência adotados para exatidão e precisão segundo a faixa de concentração de resíduo estabelecida no *Codex Alimentarius* e MERCOSUL.....121

Tabela 2. Comparação entre os parâmetros de validação obtidos pelo presente método para leite caprino e os valores encontrados na literatura para leite bovino...127

Tabela 3. Comparação da exatidão e da precisão intra-dia obtidas com valores de referência adotados.....128

Tabela 4. Avaliação da precisão intermediária pelas variáveis “dia” e “analista”.....128

Tabela 5. Avaliação estatística da robustez pelas variáveis “massa de Na₂SO₄” e “tempo de derivação do extrato”.....130

SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO GERAL	18
OBJETIVOS.....	20
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1. CLORANFENICOL.....	22
1.1. Aspectos químicos e físico-químicos	22
1.2. Mecanismo de ação.....	22
1.3. Espectro de ação.....	23
1.4. Terapêutica em humanos	24
1.5. Uso veterinário	26
1.6. Resistência bacteriana.....	27
1.7. Toxicologia	28
1.7.1. Citotoxicidade.....	28
1.7.2. Genotoxicidade	29
1.7.3. Hematotoxicidade.....	29
1.7.4. Carcinogênese.....	30
1.7.5. Teratogênese	31
1.7.6. Outros efeitos tóxicos	31
2. ASPECTOS LEGISLATIVOS.....	31
3. RESÍDUOS DE CAP EM ALIMENTOS	35
4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE CAP	36
4.1. Preparação do extrato.....	37
4.2. Purificação do extrato	38
4.3. Detecção e quantificação do CAP.....	38
4.3.1. Cromatografia gasosa (CG).....	40

4.3.2. Cromatografia líquida (CL)	41
5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPITULO II – OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE CLORANFENICOL EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS DE ORIGEM ANIMAL POR CROMATOGRAFIA GASOSA	57
---	-----------

RESUMO	58
ABSTRACT	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1. Reagentes e Solventes	62
2.2. Equipamentos.....	62
2.3. Procedimentos analíticos	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Ensaio com o padrão de CAP.....	67
3.1.1. Otimização da reação de silanização	67
3.1.2. Otimização do <i>Splitless</i>	74
3.2. Testes com matrizes	78
3.2.1. Otimização da etapa da partição para extração de CAP das matrizes camarão, mel e pólen	78
3.2.1.1. Camarão	78
3.2.1.2. Mel e Pólen.....	79
3.2.2. Avaliação da seletividade nas matrizes camarão, mel e pólen.....	81
3.2.2.1. Camarão	81
3.2.2.2. Mel e Pólen.....	85
3.2.3. Alterações nas condições cromatográficas	87
3.2.4. Alterações na etapa de purificação	91
3.2.5. Duas colunas DB1 e junção das duas SPEs	96
3.2.5.1. Alteração no comprimento da coluna capilar DB1....	96
3.2.5.2. Purificação com junção das duas colunas SPE (Sílica gel e C18).....	99

3.2.6. Outras matrizes	104
3.2.6.1. Aquisição e processamento	104
3.2.6.2. Método de extração e condições cromatográficas ..	104
3.2.6.3. Avestruz e Tilápia	105
3.2.6.4. Carnes caprinas e ovinas e leite caprino	106
3.3. Método otimizado	107
4. CONCLUSÕES	109
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	109

CAPITULO III – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM LEITE CAPRINO POR CG/DCE.....	114
--	------------

RESUMO	115
ABSTRACT	115
1. INTRODUÇÃO	116
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1. Reagentes e Solventes	118
2.2. Equipamentos Cromatográficos	119
2.3. Aquisição de Amostras.....	119
2.4. Soluções de CAP	119
2.5. Extração do analito da matriz.....	120
2.6. Purificação	120
2.7. Derivação	120
2.8. Confirmação da derivação por CG/EM	122
2.9. Separação, detecção, identificação por comparação de Tr e quantificação	122
2.10. Procedimentos de validação.....	123
2.11. Valores de referência.....	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
3.1. Extração do analito da matriz.....	124
3.2. Análise qualitativa	125
3.3. Validação do método analítico	127
3.3.1. Especificidade	127

3.3.2. Linearidade	128
3.3.3. Precisão e exatidão	129
3.3.4. Limites de detecção e quantificação	132
3.3.5. Robustez	133
4. CONCLUSÃO	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	134
CONCLUSÕES GERAIS	142
ANEXOS	143
Anexo I	144
Anexo II	145
Anexo III	146
Anexo IV	147
Anexo V	148
Anexo VI	149
Anexo VII	150
Anexo VIII	151
Anexo IX	152

RESUMO

Em várias etapas da produção de alimentos de origem animal, antibióticos como cloranfenicol (CAP) podem ser utilizados. Na terapêutica humana, CAP somente é usado contra bactérias multiresistentes devido sua ação tóxica, que pode induzir anemia aplásica no homem. O objetivo deste estudo foi otimizar as condições de preparação das amostras; a separação cromatográfica por CG/DCE; e validar o método desenvolvido ao nível intralaboratorial com as condições otimizadas. O método foi otimizado por meio de ensaios com padrões e com as matrizes músculos de camarão e de tilápia; mel; pólen; carnes de avestruz, ovina e caprina; e leite caprino. As condições otimizadas obtidas foram: derivação com CAP liofilizado e em condições de baixa umidade, a reação de silanização do CAP foi conduzida durante 15 min a 80 °C; a melhor condição de purificação foi obtida por lavagens com hexano e limpeza com SPE-C18; para as condições cromatográficas o *splitless* deve ser realizado com um *liner* de 2 mm e com a abertura da válvula *split* em 0,5 min e deve-se utilizar uma coluna DB1 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) sob as condições de temperatura de 90 °C / 1 min aumentando 60 °C/min até 200 °C / 7 min, aquecendo 5 °C/min até 230 °C / 3 min e então aquecendo 5 °C/min até 260 °C / 35,17 min. Os ensaios com as matrizes demonstraram que, nas condições avaliadas, o método não é indicado para aplicação para mel, pólen, camarão, tilápia e avestruz devido à presença de co-eluentes nas condições avaliadas. Entretanto, nas condições otimizadas, as matrizes pernil ovino, pernil caprino e leite caprino foram indicadas para o desenvolvimento de estudos de validação do método para determinar resíduos de CAP. Com isso, foi validado intralaboratorialmente o método para determinação de resíduos de CAP em leite caprino por CG/DCE. A identificação foi realizada por comparação de tempo de retenção e por CG/EM, e a quantificação foi obtida por padronização externa. O método validado para a matriz leite caprino foi específico, linear (0,998), preciso (5,8-13,4%), exato (69,87-73,71%) e robusto. O LD e LQ do método foram, respectivamente, 0,03 e 0,10 µg/kg. O método validado atende aos critérios de aceitabilidade estabelecidos pelo MERCOSUL e *Codex Alimentarius*.

Palavras-chave: Cloranfenicol, matrizes alimentícias, CG/DCE.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN DIFFERENT FOOD MATRIX

In some stages of the food production of animal origin, antibiotics as chloramphenicol (CAP) can be used. In the human therapy, CAP is only used in severes cases against multiresistant microorganisms due to your toxicological effects to the organism, which can cause an aplastic anemia. Therefore, the objective of this study was to optimize the sample preparation conditions, optimize the GC/ECD chromatographic separation conditions and validate the optimized method at in-house level with the optimized conditions. The method was optimized by assays using CAP standards and samples of muscle of shrimp and tilapia; honey; pollen; ostrich, sheep and goat meat; and goat milk. The optimized conditions were as followed: derivation with lyophilized CAP and at low humidity conditions should be used, the silanization reaction of CAP went conducted for 15 min at 80 °C; the best purification conditions were obtained by hexane washes and SPE-C18 cleaning; for the chromatography conditions, the splitless must be done with a liner of 2 mm with split valve opening at 0.5 min; it should be used an DB1 column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm), at temperature conditions as follow: 90 °C / 1 min heating 60 °C / min until 200 °C / 7 min, raising 5 °C / min until 230 °C / 3 min heating 5 °C / min until 260 °C / 35.17 min. The assays with food samples shows that the optimized conditions are not indicated for application at honey, pollen, shrimp, tilapia and ostrich meat. However, at the optimized conditions, the sheep meat, goat meat and goat milk matrix are indicated for development of studies for chloramphenicol residues validation method. With this, the goat milk CAP residues determination method were in-house validated by GC/ECD. The identification was made by retention time comparation and by GC/MS, and the quantification by external standard. The validated method for goat milk was especific, linear(0.998), precise (5.8-13.4%), exact (69.87-73.71%) and robust. The DL and QL were 0.03 and 0.10 µg/kg, respectively. The validated method attended to the MERCOSUL and *Codex Alimentarius* norms.

Keywords: chloramphenicol, food matrix, GC/ECD.

INTRODUÇÃO GERAL

Diversos antimicrobianos são utilizados para fins veterinários, tais como: penicilinas, tetraciclinas, sulfas, nitrofuranos e anfenicois (ANVISA, 2003). Dentre estes, cloranfenicol (CAP) é empregado devido seu largo espectro de ação e baixo custo. Há um consenso na comunidade internacional sobre o grande potencial toxigênico do CAP, sendo responsável por efeitos como genotoxicidade e carcinogênese (IARC, 1990; AKHTAR *et al*, 1995; WHO, 2004).

Em humanos, CAP a uma concentração plasmática de 25µg/mL, já possui uma ação tóxica, induzindo aplasia medular, o que a depender da dosagem e da duração do tratamento pode culminar em um quadro anemia aplásica (WHO, 2004; MEDSCAPE, 2008). Além da ação tóxica direta do cloranfenicol à saúde humana, a indução de resistência bacteriana pelo seu uso indevido caracteriza mais um risco ao homem. TENDENCIA & PEÑA (2001) em um estudo comparando a incidência da resistência antibiótica nas bactérias de fazendas de cultivo de camarões nas Filipinas observaram que quando os agentes antimicrobianos foram usados com frequência, maior foi a formação de cepas bacterianas resistentes à droga, o que pode vir a afetar a terapia futura dos camarões, assim como doenças humanas (TENDENCIA & PEÑA, 2001). Portanto, nota-se que o uso dos antibióticos não somente na carcinicultura como na aqüicultura como um todo, mesmo em baixas concentrações, deve ser evitado.

Com isso, o monitoramento de resíduos de CAP em alimentos tornou-se uma área de preocupação crescente e muito importante devido ao seu potencial impacto à saúde humana (KEUKENS *et al*, 1986; AKHTAR *et al*, 1995; NEUHAUS *et al*, 2002). Não existe um valor diário de ingestão de CAP definido e conseqüentemente um limite máximo de resíduo permitido também não está bem fixado, geralmente, este depende da sensibilidade dos métodos disponíveis. Devido a isto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que o uso de CAP para fins veterinários seja restrito apenas para animais que não sejam destinados a alimentação humana (WHO, 2004).

Devido a isso, diversos países têm proibido o uso de CAP em produtos alimentícios. Na União Européia (UE), Estados Unidos da América (EUA) e

Canadá, o uso de CAP em alimentos não é autorizado (COMMISSION REGULATION, 1994; NEUHAUS *et al*, 2002). A Organização Mundial da Saúde preconiza sua não utilização (WHO, 2004). No Brasil, a Portaria 448/98 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento proíbe o uso deste antibiótico em animais destinados à alimentação humana (BRASIL, 1998).

Em 2003, a ANVISA criou, através da Resolução RDC nº 253, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet) que visa avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários (RMV) pela ingestão de alimentos de origem animal (ANVISA, 2003; BRASIL, 2003).

Vários métodos tem sido publicados para a determinação de resíduos de CAP em matrizes alimentícias usando a técnica de cromatografia líquida com detector espectrômetro de massas (CL/EM) (RAMOS *et al*, 2003) ou detectores de massas acoplados em série (CL/EM/EM *tandem*) (NEUHAUS *et al*, 2002); e utilizando técnicas de cromatografia gasosa (CG) com detectores de massas e em *tandem* (CG/EM e CG/EM/EM *tandem*) (NGOC SON, 2002; IMPENS *et al*, 2003) ou detectores por captura de elétrons (CG/DCE) (PFENNING *et al*, 2000; KUBALA-DRINCIC *et al*, 2003; CERKVENIK-FLAJS, 2006). Entretanto, muitos dos estudos publicados têm sido validados em número limitado de matrizes (PENNEY *et al*, 2005).

Sendo assim, nota-se que o uso de antibióticos não autorizados para fins veterinários é um risco à saúde humana, no que se refere à toxicidade do medicamento e no surgimento de cepas bacterianas patogênicas resistentes. Por este motivo, a monitoração de resíduos de antibióticos em alimentos deve constituir um programa de vigilância. Para tanto, é necessário desenvolver e validar novas metodologias de análises para a determinação destes resíduos em diferentes matrizes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar um método de análise para a identificação e quantificação de resíduos de CAP em diferentes matrizes alimentícias utilizando as técnicas de cromatografia gasosa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições da reação de derivação (silanização) do padrão de CAP para obter maior rendimento.
- Confirmar a silanização do CAP pela técnica de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/EM).
- Otimizar a sensibilidade do cromatógrafo gasoso com detector de captura de elétrons (CG/DCE) através da otimização das condições de *splitless*.
- Otimizar as condições de extração e purificação de CAP de diferentes matrizes.
- Avaliar a seletividade do método de extração em diferentes matrizes.
- Otimizar as condições cromatográficas para a separação do resíduo de CAP das matrizes.
- Determinar para quais matrizes o método otimizado pode ser aplicado.
- Validar a metodologia otimizada no nível intralaboratorial.

CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1. CLORANFENICOL

1.1. Aspectos químicos e físico-químicos

O cloranfenicol (CAP), D-treo-N-dicloroacetil-1-p-nitrofenil-2-amino-1,3-propanodiol (Figura 1), foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir do microorganismo *Streptomyces venezuelae*, entretanto atualmente é produzido sinteticamente, podendo-se obter o CAP, o Succinato de CAP e o Palmitato de CAP (GOODMAN & GILMAN, 1991; KATZUNG, 1998; AHFS DRUG INFORMATION, 2004; MEDSCAPE, 2008).

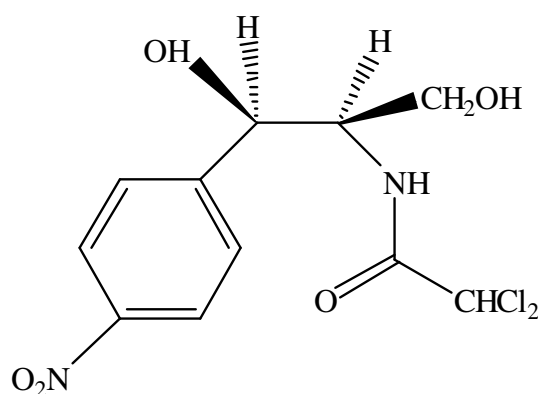


Figura 1. Estrutura química do cloranfenicol (CAP)

Cloranfenicol apresenta massa molecular $323,1 \text{ g mol}^{-1}$, fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$, ponto de ebulição de $150,5\text{-}151,5^\circ\text{C}$ e um pKa de 5,5. Possui muita solubilidade em metanol, etanol, butanol, acetato de etila e acetona, sendo pouco solúvel em éter e insolúvel em benzeno, éter de petróleo e óleos vegetais. É recomendada a estocagem a temperatura ambiente (SIGMA, 1999; MEDSCAPE, 2008).

1.2. Mecanismo de ação

O CAP usualmente possui uma ação bacteriostática, mas também pode agir como bactericida em altas concentrações ou contra alguns microorganismos com alta sensibilidade (AHFS DRUG INFORMATION, 2004; PRVADEMECUM, 2004).

O CAP difunde-se através da membrana celular bacteriana e atua inibindo a síntese protéica nos microorganismos susceptíveis por ligação a subunidade ribossomal 50S impedindo a ligação dos aminoácidos nas cadeias peptídicas em formação (WHO, 1988; EMEA, 1994; AHFS DRUG INFORMATION, 2004). O sítio de ação é o mesmo de outros antibióticos como a eritromicina, clindamicina e a lincomicina (MEDSCAPE, 2008).

O CAP também pode inibir a síntese mitocondrial de proteínas nas células de mamíferos, provavelmente porque os ribossomos mitocondriais se assemelham mais aos ribossomos bacterianos (ambos são 70S) do que aos ribossomos citoplasmáticos que são 80S nas células de mamíferos (GOODMAN & GILMAN, 1991; KATZUNG, 1998).

1.3. Espectro de ação

O CAP possui um amplo espectro de ação, sendo ativo *in vitro* contra muitas bactérias aeróbias gram-positivas e gram negativas, tais como: *Streptococcus pneumoniae* e outras *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas mallei*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Brucella*, and *Shigella*. Também é ativo *in vitro* contra alguns *Enterococcus* resistentes a vancomicina, contra o *Bacillus anthracis* e a *Yersinia pestis* (GOODMAN & GILMAN, 1991; EMEA, 1994; KATZUNG, 1998; MEDSCAPE, 2008).

É ativo *in vitro* contra algumas bactérias anaeróbias, incluindo *Bacteroides fragilis*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Prevotella melaninogenica* e *Veillonella*. *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Mycoplasma* também são inibidos pelo CAP. Por outro lado, CAP é inativo contra fungos (GOODMAN & GILMAN, 1991; KATZUNG, 1998; AHFS DRUG INFORMATION, 2004).

Entretanto, os experimentos clínicos com CAP são limitados e os resultados tem sido variáveis, devido sua alta toxicidade (GOODMAN & GILMAN, 1991; KATZUNG, 1998; MEDSCAPE, 2008).

1.4. Terapêutica em humanos

Na terapêutica humana CAP pode ser utilizado pelas vias oral, tópica e parenteral.

O CAP é disponível para a administração oral em duas formas posológicas: a própria droga ativa e a pró-droga inativa (palmitato de CAP, utilizado em preparações de suspensões orais). Em condições fisiológicas normais, a hidrólise da ligação éster do palmitato de CAP é efetuada rapidamente e de modo quase completo por lípases pancreáticas no duodeno. Seguidamente, o CAP é absorvido pelo trato gastrointestinal, com obtenção de concentrações máximas de 10 a 13 µg/mL dentro de 2 a 3 h, após a administração de uma dose de 1 g (GOODMAN & GILMAN, 1991).

A aplicação tópica é utilizada para combater infecções oculares. Neste caso, a forma farmacêutica usada são colírios (AHFS DRUG INFORMATION, 2004). WALKER *et al* (1998), monitoraram 40 pacientes tratados com colírios contendo CAP. Os autores utilizaram a técnica de CLAE (Limite de Detecção (LD) de 1 mg/L) para mensurar o acúmulo de CAP sérico após a terapia tópica. A dose média recebida pelos pacientes em 1 semana foi de 8 mg de CAP e em 2 semanas de 15,3 mg, nessa dosagem os níveis séricos de CAP foram abaixo do LD. Os autores concluíram que o uso tópico de CAP não é um fator de risco para o desenvolvimento de efeitos tóxicos doses dependentes (WALKER *et al*, 1998).

A preparação de CAP para uso parenteral é o succinato de sódio inativo hidrossolúvel (GOODMAN & GILMAN, 1991). Pela via parenteral, CAP é utilizado para o tratamento de infecções resistentes a outras drogas com menor toxicidade, tais como: febre tifóide, meningite e infecções por *B. anthracis*. A dose usual para indivíduos com funções hepáticas e renais normais é de 50mg/kg por dia para adultos e de 25mg/kg por dia para neonatos e crianças (MEDSCAPE, 2008).

Com uma única dose de 1g de Succinato Sódico de CAP via parenteral em um indivíduo adulto, a concentração plasmática de CAP fica entre 4,9 a 12 µg/mL em 1 hora e após 4 horas entre 0 a 5,9 µg/mL. CAP plasmático está em torno de 60% ligado a proteínas plasmáticas (AHFS DRUG INFORMATION, 2004).

CAP é amplamente distribuído nos tecidos e fluídos corporais, tais como: fígado, rins, saliva, fluído pleoral, fluído sinovial, leite materno e humores oculares vítreos e aquosos. É capaz de atravessar a placenta e a concentração plasmática fetal pode variar de 30 a 80 % da concentração plasmática materna (GOODMAN & GILMAN, 1991; EMEA, 1994; KATZUNG, 1998; AHFS DRUG INFORMATION, 2004; MEDSCAPE, 2008).

CAP sofre metabolismo hepático, sendo o principal mecanismo a conjugação com glucuronídeo, por ação enzimática da glucuronil-transferase. Alguns metabólitos do CAP são: CAP- glucuronídeo, CAP-oxamil-etanol-amina, CAP-álcool e CAP-aldeído (WHO, 1988; GOODMAN & GILMAN, 1991; EMEA, 1994; WHO, 1994; CRAVEDI *et al*, 1995; KATZUNG, 1998; WHO, 2004).

Em um adulto com funções renais e hepáticas normais a meia-vida plasmática do CAP esta entre 1,5 e 4,1 horas. Em prematuros e neonatos o mecanismo de conjugação glucuronídea e excreção renal ainda estão imaturos, por isso doses usuais infantis de CAP produzem altas e prolongadas concentrações plasmáticas em neonato e prematuros. Nestes casos a meia-vida plasmática é em torno de 24 horas. Em indivíduos com graves reduções na função hepática a meia-vida plasmática do CAP é prolongada (AHFS DRUG INFORMATION, 2004).

Em condições renais e hepáticas normais, entre 68 a 99% do CAP plasmático é excretado pela urina. Sendo, 5 a 15% excretado na forma inalterada e o restante na forma dos metabólitos inativos, sendo o principal o conjugado glucuronídeo (WHO, 1988; MEDSCAPE, 2008). É provável que o fármaco ativo (CAP não metabolizado) seja depurado principalmente por filtração glomerular, e o produto inativo (CAP glucuronídeo) seja depurado por secreção tubular. Apenas pequenas quantidades do fármaco ativo são excretadas na bile ou nas fezes (KATZUNG, 1998).

Entretanto, devido ao seu potencial toxicológico, CAP só é utilizado na terapêutica humana como fármaco de última escolha onde não exista a disponibilidade de outros fármacos eficazes de menor risco toxicológico.

1.5. Uso veterinário

Para fins veterinários, CAP é usado no tratamento de uma variedade de infecções em animais, particularmente aquelas causadas por bactérias anaeróbias ou aquelas que são resistentes a outras terapias antimicrobianas. CAP é bem absorvido por via oral e parenteral em animais. A faixa terapêutica usual para CAP na maioria das espécies animais é uma concentração plasmática de 5 a 15 µg/mL, sendo amplamente distribuído pelo corpo (WHO, 1994).

Assim como na espécie humana, em animais o CAP sofre metabolismo hepático, sendo a principal via de biotransformação a conjugação glucuronica, formando o metabólito inativo (WHO, 1988; WHO, 1994; WHO, 2004).

A excreção também é semelhante aos humanos sendo apenas cerca de 5 a 15 % excretado inalterado na urina, com exceção dos felinos que tem uma capacidade limitada de formar o metabólito CAP glucuronídeo, tendo assim uma excreção mais lenta, sendo neste caso 25 % ou mais da dose administrada é excretada da forma inalterada na urina. A meia-vida de eliminação do CAP é de 1,1 a 5 horas em cachorros, menos de 1 hora em potros e pôneis, e de 4 a 8 horas em gatos (MEDSCAPE, 2008).

A farmacocinética de uma dose oral em frangos indica que CAP é rapidamente absorvido. Uma dose de 30 a 50 mg/kg por peso vivo da droga chega a uma concentração plasmática >5 µg/mL em 15 min. A meia-vida de eliminação é em torno 7 horas. Os principais metabólitos em frangos são: dihidro-cloranfenicol, nitro-fenil-amino-propanodiona-cloranfenicol e nitroso-cloranfenicol (WHO, 1988; ANADON *et al*, 1994; WHO, 1994).

Em bovinos tratados com doses orais de 25 mg/kg por peso vivo de palmitato de CAP, em intervalos de 12 horas, obtiveram uma concentração plasmática de 5 a 6 µg/mL, após a quarta dose. Nestes casos a meia-vida de eliminação foi de 4,5 horas e o principal metabólito foi o dihidro-cloranfenicol, sendo este um metabólito associado ao efeito tóxico em humanos pela indução de anemia aplásica (WHO, 1988; WHO, 1994).

Entretanto, dado o potencial tóxico do CAP em humanos e por causa da possibilidade da presença do CAP e seus metabólitos em tecidos de animais tratados com a droga, o uso de CAP para fins veterinários não é permitido em

animais destinados à alimentação humana em muitos países (COMMISSION REGULATION, 1994; BRASIL, 1998a; NEUHAUS *et al*, 2002).

1.6. Resistência bacteriana

A resistência adquirida a CAP tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* por alguns tipos de *Stafilococcus*, *Salmonella*, *Shigela* e *Escherichia coli*. Raramente, tem-se notificado resistência a CAP por *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*. No caso da *N. meningitidis* a resistência a CAP tem sido reportadas em algumas áreas do mundo, como Vietnã e França. Resultados de estudos *in vitro* demonstraram resistência a CAP em isolados clínicos de *N. meningitidis* (AHFS DRUG INFORMATION, 2004; MEDSCAPE, 2008).

A resistência de microorganismos ao CAP *in vivo* constitui um problema de crescente importância clínica. A resistência bacteriana a CAP é mediada por transmissão de plasmídios que resulta na produção da enzima CAP-acetiltransferase, com isso as bactérias adquirem a capacidade de inativar o CAP por acetilação (GOODMAN & GILMAN, 1991; KATZUNG, 1998; MEDSCAPE, 2008).

TENDENCIA & PEÑA (2001) compararam a incidência da resistência antibiótica nas bactérias da água e dos sedimentos de lagoas de cultivo de camarões nas Filipinas e do ambiente circunvizinho a estas. Os resultados obtidos indicam que quando os agentes antimicrobianos são usados mais freqüentemente em um ambiente, será maior a formação de cepas bacterianas resistentes à droga, o que pode vir a afetar a terapia futura dos camarões, assim como doenças humanas. Com isto, nota-se que o uso dos antibióticos para fins veterinários, sem o devido controle, caracteriza um risco e deve ser evitado (TENDENCIA & PEÑA, 2001).

No Brasil, em 2007 foram isoladas de amostras de leite oriundas do estado do Rio de Janeiro diversas espécies de enterococos (*E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans* e *E. gilvus*) multiresistentes a antimicrobianos, o que está associado com o uso de antibióticos para fins veterinários (FRACALANZZA, 2007).

A meia-vida do CAP no solo a 25°C é de 4,5 dias; em águas de lagoas a meia-vida é de 10,3 dias a 25°C e pH 8, e 20,8 dias a 37°C e pH 6 (WHO, 2004). Esta persistência da droga no ambiente pode favorecer ao desenvolvimento de resistência em microorganismos presentes no solo.

1.7. Toxicologia

1.7.1. Citotoxicidade

Estudos *in vitro* com células da medula-óssea humana demonstram que três metabólitos de CAP estão associados a sua citotoxicidade: o nitroso-CAP, o dihidro-CAP e o nitrofenilaminopropanodiona-CAP (NPAP-CAP) (LAFARGE-FRAYSSINET *et al*, 1994; WHO, 1994; ROBBANA-BARNAT *et al*, 1997; WHO, 2004).

HOLT *et al* (1997) avaliaram a indução de apoptose por CAP em um estudo *in vitro* usando células renais de macacos e células hematopoiéticas do cordão umbilical de neonatos. Uma concentração de 2 a 5 mmol/L de CAP causou apoptose em células de ambos os sistemas. Em um estudo subsequente *in vivo* foi observado evidências de apoptose em eritróides e precursores mielóides na medula femural de ratos submetidos a uma dose de 200 mg/kg por peso vivo (HOLT *et al*, 1997; HOLT *et al*, 1998).

A indução de apoptose em células hematopoiéticas por CAP foi confirmada em estudos posteriores *in vitro* e *in vivo*. KONG *et al* (2000) observaram indução de apoptose em células purificadas da medula-óssea humana submetidas a CAP. TURTON *et al* (2002b) realizaram um estudo *in vivo* com ratos tratados com uma única dose de CAP de 4000 mg/kg por peso vivo e observaram um aumento da apoptose das células da medula femoral. Os autores sugerem que a indução de apoptose nas células progenitoras da medula pela ação tóxica do CAP pode estar associada com a indução de anemia aplásica em humanos (TURTON *et al*, 2002b).

Outro mecanismo proposto para a depressão da medula-óssea causada por CAP é a inibição da síntese protéica nas mitocôndrias das células da medula. Este efeito pode ser causado pela similaridade dos ribossomos mitocondriais e

bacterianos. Com isso, CAP pode inibir a síntese protéica de células de mamíferos (WHO, 1994; MEDSCAPE, 2008).

1.7.2. Genotoxicidade

CATALAN *et al* (1993) relataram que CAP induz modificações nas cromátides irmãs em linfócitos bovinos.

A genotoxicidade foi observada *in vitro* em células da medula-óssea humana pelo efeito de CAP e de alguns metabólitos, tais como o nitroso-CAP e o dihidro-CAP. Alguns estudos apontam que o potencial genotóxico dos metabólitos de CAP é maior em linfócitos humanos periféricos do que na medula-óssea (WHO, 1994; CHEN, 2005).

Alterações nas cromátides irmãs também foram observadas, no âmbito veterinário, em culturas de células sangüíneas de bovinos tratados com doses terapêuticas de CAP via parenteral (OTHMAN *et al*, 2005).

1.7.3. Hematotoxicidade

Dois tipos de hematotoxicidade induzidas por CAP em humanos têm sido discutidas. A primeira é mais freqüente e dose dependente, depressão reversível da medula-óssea, onde se observa uma leve anemia, sendo que o paciente retorna ao normal depois da suspensão do tratamento. A inibição da síntese protéica nas células da medula tem sido um mecanismo proposto para este efeito. O segundo efeito é a anemia aplásica que é o mais grave e não dose dependente, sendo este quadro irreversível. Neste caso, observa-se uma severa pancitopenia no sangue periférico, podendo conduzir a leucemia nos seres humanos (MALUF *et al*, 2002; TURTON *et al*, 2002a; CHEN, 2005;). CAP a uma concentração plasmática de 25 µg/mL, já possui uma ação tóxica, induzindo uma aplasia medular reversível dose dependente, que dependendo da duração do tratamento, dos efeitos idiossincráticos e genéticos pode culminar em um quadro de anemia aplásica (MORLEY *et al*, 1976; MEDSCAPE, 2008). A indução de anemia aplásica pelo uso de CAP está relacionada com uma predisposição genética do indivíduo, porém seu

mecanismo toxicológico completo ainda não foi totalmente elucidado (WHO, 2004).

Um estudo *in vitro* com células da medula-óssea de humanos de 72 doadores, demonstrou que o CAP succinato foi metabolizado em CAP e metabólitos como o nitroso-CAP e outros metabólitos não identificados. O estudo indica que os metabólitos derivados do CAP são os responsáveis pelo efeito tóxico produzido na medula óssea. Os autores mencionam que a medula-óssea funciona ao mesmo tempo como um sítio de biotransformação do fármaco e alvo da doença (AMBEKAR *et al*, 2000). Tem sido sugerido que a indução da anemia aplásica e leucemia estão relacionadas com o metabólito nitroso-CAP, produto da redução do grupo para-nitro do CAP. A capacidade de redução do grupo para-nitro é determinada geneticamente. Isto é evidenciado por estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstram que a resposta hematológica para CAP em ratos depende da raça dos mesmos (FESTING *et al*, 2001; CHEN, 2005). Entretanto, um mecanismo bioquímico exato responsável pela anemia aplásica em homens ainda não está bem elucidado (WHO, 2004).

Ao contrário do que acontece em humanos, o uso de CAP em animais não provoca anemia aplásica. Entretanto, a depressão reversível da medula-óssea é observada em algumas espécies após uma terapia longa. Os gatos possuem maior susceptibilidade aos efeitos adversos da droga quando comparados aos caninos. Outros efeitos adversos que podem ser notados em animais tratados com CAP são: anorexia, vômito, diarreia e depressão (WHO, 2004).

1.7.4. Carcinogênese

Estudos da carcinogenicidade do CAP realizados em ratos mostraram que o mesmo quando administrado através da água aumenta a incidência de linfomas e de carcinoma hepatocelular (EMEA, 1994).

A Agência Internacional para Pesquisas do Câncer (IARC) classifica o CAP no grupo 2A, o que significa que o mesmo é “provavelmente carcinogênico para humanos”. Utiliza-se esta categoria quando as evidências são limitadas para a carcinogenicidade em humanos e os dados são evidentes para a carcinogenicidade em animais experimentais. Com isso, observa-se que de

acordo com a avaliação do IARC existem evidências limitadas para carcinogenicidade do CAP em humanos (IARC, 1990; HHS, 2000).

1.7.5. Teratogênese

Em estudos de teratogenicidade com ratos e coelhos, CAP não apresentou efeitos, mas causou uma alta incidência de mortes fetais em níveis baixos de dosagem (EMEA, 1994).

1.7.6. Outros efeitos tóxicos

Prematuros e neonatos submetidos ao tratamento com CAP podem desenvolver um colapso circulatório denominado de “síndrome do bebê cinzento”. A síndrome do bebê cinzento é caracterizada por dilatação abdominal, vômito, coloração cinzenta, hipotermia, cianose pálida progressiva, respiração irregular e colapso circulatório seguido de morte em poucas horas ou dias. Um caminho para a explicação desta reação é devido a baixa taxa de biotransformação hepática da droga nos prematuros e neonatos, resultando em uma glucuronidação do CAP muito lenta. Com isso, a taxa de excreção renal é diminuída e o CAP chega a níveis tóxicos de concentração sangüínea e tecidual. Entretanto, o mecanismo preciso desta reação não está completamente elucidado (WHO, 1994; WHO, 2004).

Em tratamento via oral prolongado com doses terapêuticas de CAP podem ocorrer hemorragias e diminuição ou inibição da síntese de vitamina K seja pela depressão da medula óssea assim como pela redução da flora intestinal que também sintetiza a vitamina K (WHO, 1994).

2. ASPECTOS LEGISLATIVOS

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na Portaria nº 193, de 12 de maio de 1998, aprovou o Regulamento Técnico para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de uso veterinário, onde é citado que “o uso adequado dos antimicrobianos, deve proporcionar a

eficiência aos produtos destinados à saúde animal e à segurança para saúde pública”. Neste regulamento definiram-se como antimicrobianos “todas as substâncias utilizadas para combater microorganismos *in vivo* e *in vitro*”. O MAPA ainda determina que os antimicrobianos utilizados em terapêutica veterinária não devem ser utilizados como aditivos da ração, como promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais, sendo que é vedado o uso de CAP, penicilinas, tetraciclina e sulfonamidas sistêmicas. O período de carência do antimicrobiano deve ser determinado de acordo com a meia-vida de eliminação da droga e este deve estar presente em evidência na bula, sempre que este esteja indicado para animais que sejam destinados ao consumo humano. O mesmo é aplicado àqueles cujos produtos derivados e subprodutos também tenham o mesmo destino. Este período de carência deve ser respeitado assegurando-se a total eliminação do fármaco antes que os animais sejam destinados ao abate, ou os produtos de origem animal para o consumo humano, ou à produção de derivados (BRASIL, 1998b).

Em setembro de 1998, o MAPA proibiu através da Portaria n° 448 a fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo CAP, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana. Esta decisão foi tomada considerando os seguintes fatores: que a presença de resíduos de CAP, furazolidona e de nitrofurazona na carne, leite e ovos, oriundos de animais tratados, poderiam constituir risco à saúde pública; as informações disponibilizadas pelo Comitê de Especialistas em Resíduos de Aditivos, Contaminantes e Drogas Veterinárias do *Codex Alimentarius* FAO/WHO não possibilitam a finalização dos estudos toxicológicos e o estabelecimento dos limites máximos de resíduos dos fármacos citados; e que o arsenal farmacêutico veterinário dispõe de drogas eficazes e seguras, capazes de substituírem tais substâncias. Com isso, a importação dos fármacos CAP, furazolidona e nitrofurazona destinados ao uso veterinário, ficou condicionada a autorização prévia do Departamento de Defesa Animal – DDA, da Secretaria de Defesa Agropecuária – DAS (BRASIL, 1998a).

A instrução Normativa n° 9, de 27 de junho de 2003 do MAPA, proibiu a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação e uso

dos princípios ativos CAP e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Com isso, o MAPA cancelou as licenças e registros concedidos às matérias-primas e aos produtos acabados para uso veterinários e suscetíveis de emprego na alimentação animal contendo os princípios ativos CAP e nitrofuranos (BRASIL, 2003a).

No Anexo I, da Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, do MAPA, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) foi instituído pela Portaria Ministerial nº51, de 6 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995. A execução de suas atividades ficou a cargo do Secretário de Defesa Agropecuária, cabendo ao Coordenador Geral gerenciar o cumprimento das metas estabelecidas na operacionalização do Plano, o qual comporta ainda uma Comissão Técnica com representantes do Departamento de Defesa Animal (DDA) e do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e um Comitê Consultivo constituído por representantes de órgãos governamentais e da iniciativa privada reconhecidamente envolvidos no contexto do PNCR. O Plano prevê a adoção de Programas Setoriais para carne (PCRC), mel (PCRM), leite (PCRL) e pescado (PCRP), dos quais somente o primeiro foi implementado pela Portaria SIPA nº 01, de 8 de junho de 1988. A garantia da inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumo, quanto à presença de resíduos decorrentes do emprego de medicamentos veterinários, agroquímicos e contaminantes ambientais é possibilitada pelo Controle de resíduos. As atividades do PNCR são desenvolvidas visando conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde do consumidor, servindo como parâmetro para orientar a adoção de políticas nacionais de saúde animal e fiscalização sanitária; e impedir o abate para consumo de animais oriundos de criatórios onde se tenha constatado violação dos Limites Máximos de Resíduos (LMR's) e, sobretudo, o uso de medicamentos veterinários proibidos no território nacional. No Brasil, estabelecer LMR's é competência do Ministério da Saúde (MS). No caso de não estarem estabelecidos pelo MS, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA. Um dos objetivos

do PNCR é tornar-se parte integrante do esforço destinado à melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos de origem animal colocados à disposição da população brasileira e, secundariamente, proporcionar à nação condições de se adequar do ponto de vista sanitário, as regras do comércio internacional de alimentos preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares (FAO, OIE e OMS). É ressaltado que as principais metas do PNCR caminham no sentido da verificação do uso correto e seguro dos medicamentos veterinários, de acordo com as práticas veterinárias recomendadas e das tecnologias utilizadas nos processos de incrementação da produção e produtividade pecuária (BRASIL, 1999).

A Resolução RDC nº 253 de 16 de setembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou oficialmente o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). O programa prevê o controle de RMV em alimentos de origem animal expostos ao consumo, cuja implementação, de forma escalonada e progressiva no território nacional, contempla ações de coleta de amostras no comércio e análise de resíduos em laboratórios. Para tanto, foram definidas parcerias com as Vigilâncias Sanitárias (VISAs), Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC) (ANVISA, 2003; BRASIL, 2003b). O PAMVet possui como metas:

- Avaliar a exposição do consumidor aos RMV pela ingestão de alimentos de origem animal (ANVISA, 2003; BRASIL, 2003b).
- Implementar métodos de análise de RMV nos laboratórios de saúde pública (ANVISA, 2003; BRASIL, 2003b).
- Produzir conhecimento científico para avaliar os riscos, possibilitando subsídios para ações de vigilância sanitária para o controle de RMV em alimentos (ANVISA, 2003; BRASIL, 2003b).
- Fomentar a promoção da adoção de Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários (ANVISA, 2003; BRASIL, 2003b).

A Comunidade Européia pelo Regulamento EEC 2377/90 de 26 de junho de 1990, torna obrigatório o estabelecimento LMR's para os fármacos que são usados nos animais produtores de alimentos (COUNCIL REGULATION, 1990). Este regulamento determina que nenhum dos estados membros da

comunidade podem autorizar o uso de quaisquer medicamentos sem que a sua substância ativa tenha sido previamente estudada, sendo descritas as substâncias alvo do regulamento nos Anexos de I a IV:

- Anexo I: Lista de substâncias cujos LMR's foram estabelecidos (COUNCIL REGULATION, 1990).
- Anexo II: lista de substâncias para as quais não é necessário estabelecer LMRs (COUNCIL REGULATION, 1990).
- Anexo III: lista de substâncias cujos LMRs são provisórios (COUNCIL REGULATION, 1990).
- Anexo IV: lista de substâncias para as quais o LMR não pode ser estabelecido, devido estas representarem perigo à saúde pública. Neste Anexo consta o CAP (COUNCIL REGULATION, 1990).

Neste contexto a União Européia (EU), os EUA e o Canadá também proíbem o uso de CAP nos animais destinados a produção de alimentos para o consumo humano (COMMISSION REGULATION, 1998; NEUHAUS *et al*, 2002). A Organização Mundial da Saúde também preconiza a não utilização (WHO, 2004).

3. RESÍDUOS DE CAP EM ALIMENTOS

Apesar das restrições legais aplicadas ao uso de CAP para determinados fins veterinários, tem sido encontrados alimentos contaminados por este antimicrobiano.

A presença de resíduos de CAP já foi relatada em diversas matrizes, tais como: produtos da aquicultura (camarão, carangueijo, peixes), produtos apícolas (mel e geléia real), bovinos, suínos, eqüinos, coelhos e leite bovino. Em particular, produtos de aquicultura originários da China, Vietnã, Mianmar e Tailândia foram verificados estar contaminados com CAP (EUROPEAN DECISION, 2001; IPEA, 2001; NGOC SON, 2002; US FDA, 2002). REYBROECK (2003) analisou amostras de mel coletadas em supermercados da Bélgica pelas técnicas de ELISA e CLAE-EM. Em um total de 40 amostras contaminadas com CAP, 31 amostras eram originadas da China.

Os antibióticos são comumente utilizados em animais leiteiros, tais como bovinos, caprinos e ovinos, para o tratamento de mastites, enfermidades respiratórias e do trato reprodutivo. Isto está diretamente relacionado com a ocorrência de resíduos no leite e contribui para o aumento do número de bactérias resistentes (VASIL *et al*, 1999; OMBUI *et al*, 2000; SCHLEGELOVA *et al*, 2002; SHITANDI & STERNESJÖ, 2004; GATICA & GESCHE, 2007; ARAÚJO, 2008).

Na Alemanha amostras de bovinos, suínos e aves provenientes de fazendas e abatedouros locais, analisadas no período de 2000-2002, apresentaram do total de amostras analisadas ($n > 17500$) uma pequena fração ($< 0,2 \%$) contaminada por CAP. As concentrações encontradas variaram de 0,3 a 3,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (WHO, 2004).

Níveis de CAP foram relatados pela Diretoria Geral de Proteção à Saúde dos Consumidores da Comissão Européia em produtos alimentícios no período de 2000-2003. Dentre os produtos contaminados encontraram-se: derivados do leite (de 0,3 a 1,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mel (de 0,3 a 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; uma amostra com 38,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$), pólen (0,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$), camarão (de 0,1 a 7,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$; duas amostras com 31,89 a 297 $\mu\text{g}/\text{kg}$), carne de caranguejo (de 0,3 a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), peito de frango (de 0,4 a 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e peito de peru (0,82 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (WHO, 2004).

O Centro de Serviços Analíticos e de Experimentação (CASE) da cidade de Ho Chi Minh (Vietnã) avaliou 1128 amostras de camarão no período de janeiro à junho de 2002. O CASE reportou que 3,9 % das amostras apresentaram presença de CAP em concentrações na faixa de 0,4-1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nos primeiros 3 meses do estudo (NGOC SON, 2002).

4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE CAP

O método ideal para análise de resíduos de CAP deve ser sensível, exato e preciso, e não fornecer informações ambíguas na identificação do analito. Além disto, deve ser robusto o quanto possível e ter uma relação custo x benefício favorável. Na prática é difícil desenvolver métodos que combinem todas essas características. Tipicamente são usados três passos básicos na maioria dos métodos de análises de CAP: preparação do extrato primário da amostra;

purificação do extrato primário; e detecção e quantificação dos resíduos de CAP (WHO, 2004).

4.1. Preparação do extrato

A etapa de preparação do extrato primário usualmente é realizada com homogenização e partição com solventes orgânicos, separação entre as fases sólidas e líquidas e, por fim, remoção da gordura do extrato. No caso de amostras de fígado e rim o controle da temperatura durante a estocagem e extração da amostras é importante no intuito de evitar metabolismo *in vitro* (PARKER & SHAW, 1988; SANDERS *et al*, 1991). Para as análises de fígado e rim é necessária a hidrólise enzimática do CAP glucuronídeo (MOTTIER *et al*, 2003).

Na etapa de extração do CAP o uso dos seguintes solventes orgânicos tem sido descritos:

- Acetato de etila (VAN GINKEL *et al*, 1990; SANDERS *et al*, 1991; VAN DER HEEFT *et al*, 1991; KEUKENS *et al*, 1992; NAGATA & SAEKI, 1992; EPSTEIN, 1994; KIJAK, 1994; MUNNS *et al*, 1994; LI *et al*, 2001; NEUHAUS *et al*, 2002; IMPENS *et al*, 2003; GANTVERG *et al*, 2003; STUART *et al*, 2003).
- Acetonitrila (BORNER *et al*, 1995; PFENNING *et al*, 1998).
- Mistura de acetonitrila e tampão acetato pH 5 (POSYNIK *et al*, 2003).
- Mistura de acetonitrila e acetato de etila (PFENNING *et al*, 2002a).
- Mistura de clorofórmio e acetona (PEREZ *et al*, 2002).

A remoção da gordura comumente é realizada por partição com solventes apolares. Tem sido descritos diversos solventes para a remoção de lipídeos, alguns destes são:

- Hexano (NAGATA & SAEKI, 1992; EPSTEIN, 1994; KIJAK, 1994; CHEVALIER *et al*, 1995; GUDE *et al*, 1995; LI *et al*, 2001; PEREZ *et al*, 2002; PFENNING *et al*, 2002a; TURNIPSEED *et al*, 2002; GANTVERG *et al*, 2003; PFENNING *et al*, 2003; STOREY *et al*, 2003).

- Mistura de n-hexano e clorofórmio (1:1 v/v) (SANDERS *et al*, 1991).
- n-Heptano (RUPP *et al*, 2003; STUART *et al*, 2003).

4.2. Purificação do extrato

A técnica de extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) é a mais empregada para a purificação do extrato primário a fim de se remover as substâncias interferentes da etapa de detecção e quantificação (CHEVALIER *et al*, 1995; PFENNING *et al*, 1998; HORMAZABAL & YNDESTAD, 2001; NEUHAUS *et al*, 2002; TURNIPSEED *et al*, 2002; GANTVERG *et al*, 2003; IMPENS *et al*, 2003; MOTTIER *et al*, 2003; PFENNING *et al*, 2003; POSYNIK *et al*, 2003; STOREY *et al*, 2003; GUY, 2004; SNIEGOCKI *et al*, 2006; SNIEGOCKI *et al*, 2007).

As etapas envolvidas na SPE são:

- a) Ativação do sorvente pela passagem de solvente apropriado para condicionar a superfície do sólido.
- b) Remoção do solvente de ativação por um líquido de polaridade similar a amostra.
- c) Aplicação da amostra (etapa de sorção ou retenção dos analitos).
- d) Remoção de interferentes e parte da matriz com um solvente que não remova os analitos (etapa de lavagem).
- e) Eluição dos analitos do sorvente com um solvente (etapa de dessorção ou eluição) coletando o eluato.

4.3. Detecção e quantificação do CAP

Diversas técnicas têm sido aplicadas para a detecção e quantificação de CAP em alimentos, tais como eletroforese capilar (PEZZA *et al*, 2006; SANTOS *et al*, 2007), voltametria (AGUI *et al*, 2002; CHAI *et al*, 2006; SONG *et al*, 2007), imunoensaios (GAUDIN & MARIS, 2001; FERGUSON *et al*, 2005; SCORTICHINI *et al*, 2005), dentre outras. Entretanto, há uma predominância dos métodos que utilizam as técnicas cromatográficas (Tabela 1).

Cromatografia é uma poderosa técnica de separação baseada em diferentes interações dos componentes de uma amostra entre duas fases, uma

fixa e outra móvel (AQUINO & NUNES, 2003). As técnicas cromatográficas possuem alta sensibilidade, versatilidade, rapidez, sendo ainda exatas e precisas (AQUINO & NUNES, 2003). A cromatografia é essencialmente uma técnica de separação, porém quando associada a outras técnicas, tais como as espectrofotométricas, torna-se uma grande ferramenta analítica para identificação e quantificação de analitos em misturas complexas (CECCHI, 2003).

Tabela 1. Métodos cromatográficos utilizados na determinação de resíduos de CAP em diversas matrizes alimentícias.

Método utilizado	Matriz	Autores
CG/EM/IQN	Ovo	VAN GINKEL <i>et al</i> (1990)
CL/UV	Músculo bovino	SANDERS <i>et al</i> (1991)
CL/EM	Músculo bovino	DELÉPINE <i>et al</i> (1992)
CG/EM/IQN	Músculo bovino	EPSTEIN (1994)
CG/EM/IQN	Leite bovino	KIJAK (1994)
CG/DCE	Camarão	MUNNS (1994)
CG/EM/IQN	Ovo	BORNER <i>et al</i> (1995)
CG/DCE		
CL/UV	Fígado, rim, músculo e pele (porco e frango) e músculo e pele (truta)	HUMMERT <i>et al</i> (1995)
CG/DCE	Camarão	PFENNING <i>et al</i> 2000
CL/EM	Ovo e mel	HORMAZÁBAL <i>et al</i> (2001)
CL/UV	Leite bovino	PEREZ <i>et al</i> (2002)
CL/EM/EM/ESI	Camarão	PFENNING <i>et al</i> (2002b)
CL/EM/EM	Camarão	NEUHAUS <i>et al</i> (2002)
CG/DCE		
CG/EM/IQN	Camarão	NGOC SON (2002)
CL/EM/EM/APCI		
CL/EM/EM	Mel	VERZEGNASSI <i>et al</i> (2003)
CL/EM	Camarão	RAMOS <i>et al</i> (2003)
CL/EM/EM/APCI	Músculo equino, suíno e bovino	GANTVERG <i>et al</i> (2003)
CG/EM/EM		
CL/EM/EM	Camarão	IMPENS <i>et al</i> (2003)
CL/EM/EM/ESI	Músculo de peru, vaca, peixe e camarão	MOTTIER <i>et al</i> (2003)
CL/EM/EM/ESI	Camarão e caranguejo	STOREY <i>et al</i> (2003)
CG/DCE		
CG/EM/IQN	Músculo bovino	USDA (2003)
CL/EM/ESI	Camarão	PFENNING <i>et al</i> (2003)
CL/EM/EM	Caranguejo	RUPP <i>et al</i> (2003)
CG/DCE	Músculo bovino, suíno e de frangos	KUBALA-DRINCIC <i>et al</i> (2003)

Tabela 1. Métodos cromatográficos utilizados na determinação de resíduos de CAP em diversas matrizes (continuação).

CL/EM/EM/ESI	Mel	ORTELLI <i>et al</i> (2004)
CL/EM/EM/ESI	Leite em pó	GUY <i>et al</i> (2004)
CL/EM	Ovo, músculo e fígado de frango; leite, músculo e rim bovino	PENNEY <i>et al</i> (2005)
CL/EM/EM/ESI	Leite bovino	GALLO <i>et al</i> (2005)
CL/EM/EM/ESI	Frango	CHEN <i>et al</i> (2005)
CG/EM/IE	Trutas	SANTOS <i>et al</i> (2005)
CL/EMEM/ESI	Músculo suíno	CERKVENIK-FLAJS (2006)
CG/DCE	Leite bovino	NICOLICH <i>et al</i> (2006)
CL/EM/EM	Leite bovino e mel	JUNIOR <i>et al</i> (2006)
CG/EM/EM/IQN	Leite bovino	SNIEGOCKI <i>et al</i> (2006)
CG/EM/IQN	Fígado de frango, músculo suíno e peixe	LI <i>et al</i> (2006)
CG/EM/EM/IQN	Leite bovino	SNIEGOCKI <i>et al</i> (2007)
CL/EM/EM/ESI	Leite bovino	RODZIEWICZ & ZAWADZKA (2008)
CG – Cromatografia Gasosa	EM/EM – Detectores de massas em <i>tandem</i>	
CL – Cromatografia Líquida	IE – Ionização por Impacto de Elétrons	
DCE – Detector de Captura de Elétrons	IQN – Ionização Química Negativa	
UV – Detector de Ultravioleta	ESI – Ionização por Eletro-spray	
EM – Detector de massas	APCI – Ionização Química em Pressão Atmosférica	

4.3.1. Cromatografia gasosa (CG)

A aplicação da técnica de CG usualmente requer um passo adicional de derivação da molécula de CAP, quando comparada a CL, devido à presença de grupos funcionais polares na molécula do antibiótico. A reação mais comumente usada é a silanização. A reação de silanização é frequentemente catalisada por ácidos ou bases (WHO, 2004). Alguns dos reagentes que podem ser utilizados são:

- Uma mistura de hexametildisilazano (HMDS), trimetilclorosilano (TMCS) e piridina (BERRY, 1987; GUDE *et al*, 1995)
- N,O-bis (trimetilsilil)-trifluoracetamida (BSTFA) (BORIES *et al*, 1983; COSTA, 1993)

- Uma mistura de BSTFA e TMCS (VAN GINKEL *et al*, 1990; KEUKENS *et al*, 1992; GANTVERG *et al*, 2003)
- Nmetil-N(trimetilsilil)-trifluoracetamida (MSTFA) (IMPENS *et al*, 2003)

Os métodos de determinação de CAP por CG usam comumente os detectores de captura de elétrons (DCE) e de espectrometria de massas (EM). O DCE possui uma alta seletividade e sensibilidade para compostos de alta eletronegatividade, em especial para os halogenados (COLLINS *et al*, 1995; LANÇAS, 1993; SKOOG *et al*, 2002; AQUINO & NUNES, 2003; CECCHI, 2003). A molécula de CAP possui dois átomos de cloro o que a torna detectável para o DCE.

No caso do acoplamento do CG com o espectrômetro de massas a ionização do analito pode ser obtida por duas técnicas: a ionização química (IQ); e a ionização por impacto de elétrons (IE). Ionização química negativa (IQN) apresenta um número limitado de fragmentos de massa; entretanto, o íon molecular está sempre presente no espectro obtido. O CG/EM no modo de IQN é uma técnica confiável para confirmação de resíduos de CAP, devida a alta eletronegatividade atribuída pela presença dos dois átomos de cloro da molécula de CAP. O CG/EM no modo de IE produz espectros com grande quantidade de fragmentos, sendo mais reprodutíveis em equipamentos diferentes, e possibilitam a estocagem em bases de dados eletrônicas com a finalidade de referência, tais como a biblioteca de espectros NIST. Entretanto, a IE é menos sensível quando comparada a IQ (WHO, 2004; SIQUEIRA, 2007).

NGOC SON (2002) analisou matrizes de camarão do Vietnã utilizando métodos de CG/DCE e CG/EM/IQN obtendo limites de detecção (LD), respectivamente, de 0,05 e 0,3 µg/kg.

4.3.2. Cromatografia líquida (CL)

Por CL a análise de resíduos de CAP tem sido relatada, principalmente, o uso de dois detectores: Ultravioleta (UV) (SANDERS *et al*, 1991; PEREZ *et al*, 2002) e o detector de EM (IMPENS *et al*, 2003; MOTTIER *et al*, 2003; STOREY *et al*, 2003). O desenvolvimento de detectores de massas com ionização química em pressão atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), e com ionização por eletrospray (ESI, *Electrospray Ionization*)

transformou a CL numa técnica universal e de alta sensibilidade, permitindo a detecção e quantificação de analitos polares e não voláteis sem o processo de derivatização. Com isso, as técnicas de CL/EM tem sido amplamente empregadas na determinação de CAP em alimentos (Tabela 1). Atualmente, a CL tem sido utilizada em associação a EM em *tandem* (CL/EM/EM), que corresponde a associação de quadrupolos (analisadores de massas) em série, isto propiciou um ganho de sensibilidade e seletividade a técnica.

NEUHAUS *et al* (2002) descreveram um método CL/EM/EM com um LD de 0,08 µg/kg para determinação de CAP em caranguejos. GANTVERG *et al* (2003) desenvolveram um método muito sensível para detecção e confirmação de CAP em músculo suíno, bovino e urina. Após extração, o CAP foi determinado através da técnica CL/EM/EM com APCI obtendo um LD de 0,02 µg/kg.

5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar pelo processo de validação. Com isso, o método torna-se capaz de mostrar qualidade nas medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (RIBANI, 2004).

Segundo LANÇAS (2004), validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar valido, tornar legitimo ou legal. Visa a diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação tais como os cromatograficos, são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI, 2004).

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferência na determinação (LANÇAS, 2004). A seletividade garante que o sinal obtido na resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1995). É obtida por meio de curvas de calibração construídas relacionando à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo (LANÇAS, 2004).

A expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra é chamada de precisão (LANÇAS, 2004). A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI, 2004). O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. Segundo ICH (1995) e BRASIL (2003c) deve-se utilizar um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração, ou seja, ensaios em triplicata para três níveis de concentração.

Limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato. Ao passo que, o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada (LANÇAS, 2004).

A medida da capacidade de um método e não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método, é chamada de robutez (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004).

Dentro do âmbito geral do processo de validação é possível distinguir dois tipos: Intralaboratorial e Interlaboratorial. O nível intralaboratorial consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, sendo também chamada de "*in house validation*". No nível interlaboratorial, verifica-se como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelencendo assim a reprodutibilidade do método (RIBANI, 2004).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUI, L.; GUZMÁN, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Voltammetric determination of chloramphenicol in Milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. **Analytica Chimica Acta**. Madrid, v. 461, p. 65-73, 2002.
- AHFS DRUG INFORMATION. **American Society of Health-System Pharmacists**. EDITORIAL STAFF, 2004.
- AMBEKAR, C. S.; CHEUNG, B.; LEE, J. ; CHAN, L. C.; LIANG, R.; KUMANA, C. R. Metabolism of chloramphenicol succinate in human bone marrow. **European Journal of Clinical Pharmacology**. Hong Kong, v. 56, p. 405-409, 2000.
- ANADON, A.; BRINGAS, P.; MARTINEZ-LARRANAGA; DIAZ, M. J. Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Madrid, v. 17, p. 52-58, 1994.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)**. 2003.
- AQUINO, F. R.; NUNES, D. S. S. 2003. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Interciência, p. 5-101.
- ARAÚJO, V. J. A. **Qualidade do leite de cabra *in natura* processado em mini-usinas do médio Sertão e Cariri paraibano - Estudo Comparativo**. Patos, 2008. 62f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, 2008.
- BERRY, D. J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in small biological samples. **Journal of Chromatography**. [s.l.], v. 385, p. 337-341, 1987.
- BORIES, G. S. F.; PELERAN, J.C.; WAL, J. M. Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues. **Journal of AOAC International**. [s.l.], v. 66, n. 6, p. 1521-1526, 1983.

BORNER, S.; FRY, H.; BALIZS, G.; KROKER, R. Confirmation of chloramphenicol residues in egg by gas chromatography/high resolution mass spectrometry and comparison of quantitation with gas chromatography electron capture detection. **Journal of AOAC International**. Berlin, v. 78, n. 5, 1995.

BRASIL. Portaria n° 448, de 10 de setembro de 1998a. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 Nov. 2007.

BRASIL. Portaria n° 193, de 12 de maio de 1998b. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 Nov. 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 Nov. 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n.9, de 27 de junho de 2003a. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 Nov. 2007.

BRASIL. Resolução RDC n. 253, de 16 de setembro de 2003b. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

BRASIL. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003c. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

CATALAN, J.; MORENO, C.; ARRUGA, M. V. Sister-chromatid exchanges induced by chloramphenicol on bovine lymphocytes. **Mutation Research**. v. 319, p. 11-18, 1993.

CECCHI, H. M. 2003. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Unicamp, p. 163-190.

CERKVENIK-FLAJS, V. Performance characteristics of an analytical procedure for determining chloramphenicol residues in muscle tissue by gas chromatography-electron capture detection. **Biomedical Chromatography**. Slovenia, v. 20, p. 985-992, 2006.

CHAI, C.; XU, M.; LIU, G. Effect of cationic surfactant on the voltammetric determination of chloramphenicol residue in Milk. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. Shanghai, v. 34, p. 1715-1718, 2006.

CHEN, X.; YUE, Z.; JI, C.; LIANG, S. Analysis of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in chickens by high performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**. China, v. 23, n° 1, p. 92-95, 2005.

CHEVALIER, M.; POCHARD, M. F.; BEL, B. Determination of chloramphenicol residues by reverse phase high-performance liquid chromatography in foies grás. **Food additives and Contaminants**. France, v. 12, p. 101-106, 1995.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. 1995. **Introdução a métodos cromatográficos**. Unicamp, p. 55-76.

COMMISSION REGULATION. **Official Journal of the European Communities**. L156. 1994. Disponível em: <<http://www.ojec.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

COMMISSION REGULATION. **Official Journal of the European Communities**. L142, 20. 1998. Disponível em: <<http://www.ojec.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

COSTA, M. H. Evaluation of residues of chloramphenicol in liver, kidney, muscle and blood of rabbits and stability studies during storage and after a cooking procedure. In: PROCEEDINGS OF THE EURORESIDUE CONFERENCE, II, 1993, Netherlands. **II PROCEEDINGS OF THE EURORESIDUE CONFERENCE**. Netherlands: 1993. p. 246-250.

COUNCIL REGULATION. **Official Journal of the European Union**. L224. 1990. Disponível em: <<http://www.pharmacos.eudra.org>>. Acesso em: 18 Dez. 2007.

CRAVEDI, J.; PERDU-DURAND, E.; BARADAT, M.; ALARY, J.; DEBRAUWER, L.; BORIES, G. Chloramphenicol oxamylethanolamine as an end product of chloramphenicol metabolism in rat and humans: evidence for the formation of a phospholipid adduct. **Chemical Research in Toxicology**. France, v. 8, p. 642-648, 1995.

DELÉPINE, B. & SANDERS, P. Determination of chloramphenicol in muscle using a particle beam interface for combining liquid chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. France, v. 582, p. 113-121, 1992.

EMEA. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products. **Chloramphenicol, Summary report**. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 1994. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu>>. Acesso em: 15 Jul. 2008.

EPSTEIN, R. L. International validation study for the determination of chloramphenicol in bovine muscle. **Journal of AOAC International**. Washington, v. 77, p. 570-576, 1994.

EUROPEAN DECISION. **Official Journal of the European Union**. L251. 2001. Disponível em: <<http://forum.europa.eu.int>>. Acesso em: 14 Nov. 2007.

FERGUSON, J.; BAXTER, A.; YOUNG, P.; KENNEDY, G.; ELLIOTT, C.; WEIGEL, S.; GATERMANN, R.; ASHWIN, H.; STEAD, S.; SHAMAN, M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and Milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex[®] kit chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**. Northern Ireland, v. 529, p. 109-113, 2005.

FESTING, M. F. W.; DIAMANTI, P.; TURTON, J. A. Strain differences in haematological response to chloramphenicol succinate in mice: implications for toxicological research. **Food and Chemical Toxicology**. London, v. 39, p. 375-383, 2001.

FRACALANZZA, S. A. P.; SCHEIDEGGER, E. M. D.; SANTOS, P. F.; LEITE, P. C.; TEIXEIRA, L. M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized Milk in Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 102, p. 853-859, 2007.

GALLO, P.; NASI, A.; VINCI, F.; GUADAGNUOLO, G.; BRAMBILLA, G.; FIORI, M.; SERPE, L. Development of liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramphenicol residues in milk after alfa-1-acid glycoprotein affinity chromatography. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. Italy, v. 19, n. 4, p. 574-579, 2005.

GANTVERG, A.; SHISHANI, I.; HOFFMANN, M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine. **Analytica Chimica Acta**. Canadá, v. 483, p. 125-135, 2003.

GATICA, C. P. & GESCHE, E. R. Método de las 5 placas para la detección de resíduos de antibacterianos em leche. **Revista Científica (Maracaíbo)**. Chile, v. 17, n° 3, p. 231-238, 2007.

GAUDIN, V. & MARIS, P. Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk. **Food and Agricultural Immunology**. France, v. 13, n° 2, p. 77-86, 2001.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. 1991. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Guanabara Koogan, p. 746-749.

GUDE, T.; PREISS, A.; RUBACH, K. Determination of chloramphenicol in muscle, liver, kidney and urine of pigs by means of immunoaffinity chromatography and gás chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography B**. Berlin, v. 673, p. 197-204, 1995.

GUY, P. A.; DELPHINE, R.; MOTTIER, P.; GREMAUD, E.; PERISSET, A.; STADLER, R. H. Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. Switzerland, v. 1054, p.365-371, 2004.

HHS. US Department of Health and Human Services. **Report on Carcinogens Background Document for Chloramphenicol**. 2000. Disponível em: <<http://www.hhs.gov>>. Acesso em: 26 Mar. 2008.

HOLT, D. E.; RYDER, T. A.; FAIRBAIRN, A.; HURLEY, R.; HARVEY, D. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: I. In vitro effects on cells in culture. **Human & Experimental Toxicology**. London, v. 16, p. 570-576, 1997.

HOLT, D. E.; ANDREWS, C. M.; PAYNE, J. P.; WILLIAMS, T. C.; TURTON, J. A. The myelotoxicity of chloramphenicol: in vitro and in vivo studies: II. In vivo myelotoxicity in the B6C3F1 mouse. **Human & Experimental Toxicology**. London, v. 17, p. 8-17, 1998.

HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, honey, and urine using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. Norway, v. 24, n° 16, p. 2477-2486, 2001.

HUMMERT, C.; LUCKAS, B.; SIEBENLIST, H. Determination of chloramphenicol in animal tissue using high performance liquid chromatography with a column switching system and ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**. Germany, v. 668, n° 1, p. 53-58, 1995.

IARC. International Agency for Research On Câncer. **Chloramphenicol**. [s.l.], v. 50, p. 169-193, 1990. Disponível em:<<http://www.inchem.org>>. Acesso em: 05 Jul. 2008.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. [s.l.], 1995.

IMPENS, S.; REYBROECK, W.; VERCAMMEN, J.; COURTHEYN, D.; OOGHE, S.; WASCH, K.; SMEDTS, W.; BRABANDER, H.. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. **Analytica Chimica Acta**. Belgium, v. 483, p. 153-163, 2003.

IPEA. Embargo à carne expõe dificuldades de exportações. Relatório nº 010/2001. **Gazeta Mercantil**, 20 Fev. 2001.

JUNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “*tandem*” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.

KATZUNG, B. G. 1998. **Farmacologia básica e clínica**. Guanabara Koogan, p. 528-529.

KEUKENS, H. J.; AERTS, M. M. L.; TRAGA, W. A. Determination of chloramphenicol residues in aquatic products by gas chromatography. **Journal of AOAC International**. [s.l.], v. 75, p. 245-256, 1992.

KONG, C. T.; HOLT, D. E.; MA, S. K.; LIE, A. K. W.; CHAN, L. C. Effects of antioxidants and a caspase inhibitor on chloramphenicol-induced toxicity of human boné marrow and HL-60 cells. **Human & Experimental Toxicology**. Hong Kong, v. 19, p. 503-510, 2000.

KIJAK, P. J. Confirmation of chloramphenicol residues in bovine milk. **Journal of AOAC International**. Beltsville, v. 77, p. 34-40, 1994.

KUBALA-DRINCIC, H.; BAZULIC, D.; SAPUNAR-POSTRUZNIK, J.; GRUBELIC, M.; STUHNE, G. Matrix solid-phase dispersion extraction and gás chromatography determination of chloramphenicol in muscle tissue. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. Croatia, v. 51, p. 871-875, 2003.

LAFARGE-FRAYSSINET, C.; ROBBANA-BARNAT, S.; FRAYSSINET, C.; TOUCAS, L.; DECLOITRE, F. Cytotoxicity and DNA damaging potency of

chloramphenicol and six metabolites: A new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. **Mutation Research**. France, v. 320, p. 207-215, 1994.

LANÇAS, F. M. 1993. **Cromatografia em fase gasosa**. Acta, p. 9-132.

LANÇAS, F. M. 2004. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. Rima, p. 1-34.

LI, T. L.; CHUNG-WANG, Y. J.; SHIH, Y. C. Determination and confirmation of chloramphenicol residues in swine muscle and liver. **Journal of Food Science**. Taiwan, v. 67, p. 21-28, 2001.

LI, P.; QIU, Y.; CAI, H.; KONG, Y.; TANG, Y.; WANG, D.; XIE, M. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**. Beijing, v. 24, n° 1, p.14-18, 2006.

MALUF, E. Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. **American Journal of Hematology**. Curitiba, v. 71, p. 268-274, 2002.

MEDSCAPE. Chloramphenicol. **Drug Reference**. 2008. Disponível em: <<http://www.medscape.com>>. Acesso em: 12 Nov 2008.

MORLEY, A.; TRAINOR, K. REMES, J. Residual marrow damage: possible explanation for idiosyncrasy to chloramphenicol. **British Journal of Haematology**. [s.l]; v. 32; p. 525-531, 1976.

MOTTIER, P.; PARISOD, V.; GREMAUD, E.; GUY, P. A.; STADLER, R. H. Determination of antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. Switzerland, v. 994, p. 75-84, 2003.

MUNNS, R. K.; HOLLAND, D. C.; ROYBAL, J. E.; STOREY, J. M.; LONG, A. R.; STEHLY, G. R.; PLAKAS, S. M. Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp interlaboratory study. **Journal of AOAC International**. Denver, v. 77, p. 596-601, 1994.

NAGATA, T.; SAEKI, M. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**. Japan, v. 15, p. 2045, 1992.

NEUHAUS, B. K.; HURLBUT, J. A.; HAMMACK, W. LC MS/MS analysis of CAP in shrimp. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4290**. Bothell, v. 18, n. 9, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

NGOC SON, C.P. Chloramphenicol analysis in shrimp. **CASE study of GC and HPLC-MS validation at the Centre of Analytical Services and Experimentation (CASE) of Ho Chi Minh City**. Vietnã, 2002. Disponível em: <<http://www.hcmuaf.edu.vn>>. Acesso em: 10 Abr. 2006.

NICOLICH, R. S.; BARROSOS, E. W.; MARQUES, M. A. S. Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by HPLC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**. Rio de Janeiro, v. 565, p. 97-102, 2006.

OMBUI, J. N.; KIMOTHO, A. M.; NDUHIU, J. G. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. **East African Medical Journal**. Kenya, v. 77, p. 463-467, 2000.

ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chromatographia**. Switzerland, v.59, p. 61-64, 2004.

OTHMAN, E. O.; EL-RAFEY, G. A.; HASSAN, T. A. Cytogenetic and hematological effects of the antibiotic chloramphenicol on calves. **Cytologia**. Egypt, v. 70, p. 79-86, 2005.

PARKER, R.; SHAW, I. C. Determination of chloramphenicol in tissues-problems with *in vitro* metabolism. **The Analyst**. [s.l.], v. 113, p. 1875-1876, 1988.

PENNEY, L.; SMITH, A.; COATES, B.; WIJEWICKREME, A. Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. Canada, v. 88, p. 645-653, 2005.

PEREZ, N.; GUTIERREZ, R. ; NOA, M. ; DIA, G. ; LUNA, H. ; ESCOBAR, I. ; MUNIVE, Z. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans and chloramphenicol residues in pasteurized milk. **Journal of AOAC International**. v. 85, p. 20-24, 2002.

PEZZA, L.; RÍOS, À.; NOZAL, L.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínética micelar. **Química Nova**. Araraquara, v. 29, n° 5, p. 926-931, 2006.

PFENNING, A. P.; MADSON, M. R.; ROYBAL, J. E.; TURNIPSEED, S. B.; GONZALES, S. A.; HURLBUT, J. A.; SALMON, G. D. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**. Denver, v. 81, p. 714-720, 1998.

PFENNING, A. P.; ROYBAL, J. E.; RUPP, H. S.; TURNIPSEED, S. B.; GONZALES, S. A.; HURLBUT, J. A. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**. Denver, v. 83, p. 26-30, 2000.

PFENNING, A. P.; TURNIPSEED, S.; ROYBAL, J.; BURNS, C.; MADSON, M.; STOREY, J.; LEE, R. Confirmation of multiple phenicol residues in shrimp by electrospray LC-MS. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4284**. Denver, v. 18, 2002a. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

PFENNING, A. P.; TURNIPSEED, S.; ROYBAL, J.; BURNS, C.; MADSON, M.; STOREY, J.; LEE, R. Confirmation of chloramphenicol residues in crawfish by electrospray LC/MS. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4289**. Denver, v. 18, 2002b. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

PFENNING, A. P.; TURNIPSEED, S.; ROYBAL, J.; MADSON, M.; STOREY, J.; LEE, R. Confirmation of chloramphenicol residue in crab by electrospray LC/MS. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4294**. Denver, v. 19, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSKA, J. Evaluation of sample preparation for control of CAP residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. Pologne, v. 483, p. 307-311, 2003.

PRVADEMECUM. **Isilo Version 4**. 2004.

RAMOS, P. M.; RODRIGUEZ, I.; ARANDA, A.; DIAZ, R.; BLANCA, J. Determination of chloramphenicol residues in shrimp by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. Madrid, v. 791, p. 31-38, 2003.

REYBROECK, W. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. **APIACTA**. Belgian, v. 38, p. 23-30, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBBANA-BARNAT, S.; DECLOITRE, F. ; FRAYSSINET, C. ; SEIGNEURIN, J. M. ; TOUCAS, L. ; LAFARGE-FRAYSSINET, C. Use of human lymphoblastoid cells to detect the toxic effect of chloramphenicol and metabolites possibly involved in aplastic anemia in man. **Drug and Chemical Toxicology**. France, v. 20, p. 239-253, 1997.

RODZIEWICZ, L. & ZAWADZKA, I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography–elektrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**. Poland, v. 75, p. 846-850, 2008.

RUPP, H. S.; STUART, J. S.; HURLBUT, J. A. LC-MS/MS Analysis of chloramphenicol in crab meat. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4302**. Denver, v. 19, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

SANDERS, P.; GUILLOT, P.; DAGORN, M.; DILMAS, J. M. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative analysis of chloramphenicol residues in aquatic products. **Journal of AOAC International**. v. 74, p. 483, 1991.

SANTOS, L.; BARBOSA, J.; CASTILHO, M. C.; RAMOS, F.; RIBEIRO, C. A. F.; SILVEIRA, M. I. N. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gás chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. Portugal, v. 529, p. 249-256, 2005.

SANTOS, S. M.; HENRIQUES, M.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. **Talanta**. Portugal, v. 71, p. 731-737, 2007.

SCHLEGELOVA, J.; BABÁK, V.; KLÍMOVÁ, E.; LUKÁSOVÁ, J.; NAVRÁTILOVÁ, P.; SUSTÁCKOVÁ, A.; SEDIVÁ, I.; RYSÁNEK, D. Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. Hudcova, v. 49, p. 216-225, 2002.

SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; HAOUET, M. N.; BENEDETTI, F.; KRUSTEVA, I.; GALARINI, R. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the

Commission Decision 2002/657/EC criteria. **Analytica Chimica Acta**. Italy, v. 535, p. 43-48, 2005.

SHITANDI, A.; STERNESJÖ, A. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large and small scale produces in Kenya. **Journal of Dairy Science**. Kenya, v. 87, p. 4145-4149, 2004.

SIGMA. **Product Information: Chloramphenicol**. USA: Sigma-Aldrich Company, 1999. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em 22 Set. 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. 2002. **Princípios de análise instrumental**. Oficial da Sociedade Brasileira de Química, p. 101-133.

SNIEGOCKI, T.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Validation of the gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of chloramphenicol residues in milk. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. Poland, v. 50, p. 353-357, 2006.

SNIEGOCKI, T.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Determination of chloramphenicol residues in milk by gas and liquid chromatography mass spectrometry methods. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. Poland, v. 51, p. 59-64, 2007.

SONG, W. W. ; DING, M. X.; ZHANG, N. W.; LIU, H. F.; XU, M. G.; LIU, G. Y.; CHAI, C. Y. Immuno-voltammetric determination of chloramphenicol residues in milk. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. China, v. 35, p. 1731-1735, 2007.

STOREY, J.; PFENNING, A.; TURNIPSEED, S.; NANDREA, G.; LEE, R.; BURNS, C.; MADSON, M. Determination of chloramphenicol residues in shrimp and crab tissues by electrospray triple quadrupole LC-MS/MS. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4306**. Denver, v. 19, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

STUART, J. S.; RUPP, H. S., HURLBUT, J. A. LC-MS/MS analysis of chloramphenicol in crawfish meat. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4303**. Denver, v. 19, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

TENDENCIA, E. A. & PEÑA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**. Philippines, v. 195, p. 193-204, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 01 Dez 2006.

TURNIPSEED, S.; BURNS, C.; STOREY, J.; LEE, R.; PFENNING, A. Confirmation of multiple phenicol residues in honey by electrospray LC/MS. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4281**. Denver, v. 8, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

TURTON, J. A. ; ANDREWS, C. M.; HAVARD, A. C.; WILLIAMS, T. C. Studies on the haematotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. **International Journal of Experimental Pathology**. London, v. 83, p. 225-238, 2002a.

TURTON, J. A. ; ANDREWS, C. M.; HAVARD, A. C.; WILLIAMS, T. C.; ROBINSON, S.; YORK, M.; GIBSON, F. M. Haemotoxicity of thiamphenicol in the BALB/c mouse and wistar Hanover rat. **Food and Chemical Toxicology**. London, v. 40, p. 1849-1861, 2002b.

USDA. United States Department of Agriculture. Determination and confirmation of chloramphenicol in bovine muscle. **Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science**. 2003. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov>>. Acesso em: 11 Nov. 2007.

USFDA. US Food and Drug Administration. **FDA increases sampling of imported shrimp and crayfish (crawfish)**. 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007..

VAN DER HEEFT, E.; JONG, A. P.; VAN GINKEL, L. A.; VAN ROSSUM, H. J.; ZOMER, G. Conformation and quantification of chloramphenicol in cow's urine, muscle and eggs by electron capture negative ion chemical ionization gás chromatography/mass spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**. Netherlands, v. 20, p. 763-770, 1991.

VAN GINKEL, L. A.; VAN ROSSUM, H. J.; ZOONTJES, P. W.; VAN BLITTERSWIJK, H.; ELLEN, G.; VAN DER HEEFT, E.; JONG, A. P. J. M.; ZOMER, G. Development and validation of a gas chromatographic –mass spectrometric procedure for the identification and quantification of residues of chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**. Bilthoven, v. 237, p. 61-69, 1990.

VASIL, M. Resistance to antibiotics in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cow mastitis, milk, udder smears, and milking installation. **Veterinarni Medicina**. Czech Republic, v. 44, p. 115-120, 1999.

VERZEGNASSI, L.; ROYER, D.; MOTTIER, P.; STADLER, R. H. Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**. Switzerland, v. 20, p. 335-342, 2003.

WALKER, S.; DIAPER, C. J. M.; BOWMAN; R.; SWEENEY, G.; SEAL, D. V.; KIRKNESS, C. M. Lack of evidence for systemic toxicity following topical chloramphenicol use. **Journal Eye**. Glasgow, v. 12, p. 875-879, 1998.

WHO. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety World Health Organization toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **WHO Food Additives Series n° 23**. Geneva, 1988. Disponível em: <<http://www.inchem.org>>. Acesso em: 19 Ago. 2008.

WHO. World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **WHO Food Additives Series n° 33**. Geneva, 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org>>. Acesso em: 19 Ago. 2008

WHO. World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **WHO Food Additives Series n° 53**. Geneva, 2004. Disponível em: <<http://www.inchem.org>>. Acesso em: 30 Jul. 2008.

CAPITULO II

OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE RESIDUO DE CLORANFENICOL EM MATRIZES ALIMENTÍCIAS DE ORIGEM ANIMAL POR CROMATOGRÁFIA GASOSA

RESUMO

Na produção de alimentos de origem animal podem ser utilizados antibióticos como o cloranfenicol (CAP) não só no tratamento de doenças, mas também subterapêuticamente para manter a saúde e promover o crescimento. Na terapêutica humana CAP somente é usado em casos graves contra microorganismos multiresistentes devido sua ação tóxica ao organismo, podendo provocar um quadro de anemia aplásica. O objetivo deste estudo foi otimizar as condições de preparação das amostras, assim como, otimizar as condições de separação cromatográficas por CG/DCE, para a determinação de resíduos de CAP em diferentes matrizes alimentícias de origem animal. Foram otimizadas as condições de derivação e de *splitless* por meio de ensaios com padrões. Por meio de ensaios com as matrizes camarão; mel; pólen; carnes de avestruz, tilapia, carpina e ovina; e leite caprino foram otimizadas as condições de extração, purificação e definidas as condições cromatográficas. As condições otimizadas foram: derivação utilizando o CAP liofilizado e em condições de baixa umidade, reagindo por 15 min a 80 °C; a melhor condição de purificação foi obtida por lavagens com hexano e limpeza com SPE-C18; na otimização das condições cromatográficas foi determinado que o *splitless* deve utilizar um *liner* de 2 mm e a abertura da válvula *split* em 0,5 min, deve-se utilizar uma coluna DB1 com 60 m para obter-se maior eficiência de separação sob as condições de temperatura de 90 °C / 1 min aumentando 60 °C/min até 200 °C / 7 min, aquecendo 5 °C/min até 230 °C / 3 min e então aquecendo 5 °C/min até 260 °C / 35,17 min. As condições otimizadas não são indicadas para aplicação nas matrizes mel, pólen, camarão, tilápia e avestruz devido à presença de co-eluentes nas condições avaliadas. Nas condições otimizadas, as matrizes pernil de carneiro, pernil de bode e leite de cabra são indicadas para o desenvolvimento de estudos de validação do método para determinar resíduos de CAP.

Palavras-chave: Cloranfenicol resíduo, matrizes alimentícias, CG/DCE.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN ANIMAL FOOD MATRIX BY GAS CHROMATOGRAPHY

In the production of foods of animal origin can be used antibiotics as chloramphenicol (CAP) not only for disease treatments but also to maintenance of health and to promote growth. CAP is only used at human therapy in severes cases against multiresistant microorganisms due to your toxicological effects to the organism, that can cause an aplastic anemia. Therefore, the objective of this study was to optimize the sample preparation conditions as well as optimize the GC/ECD chromatographic separation conditions to determinate CAP residues at different animal food matrix. The derivation and splitless conditions were optimized by assays with standards. By assays using shrimp, honey, pollen, ostrich meat, sheep meat, tilapia, goat meat and goat milk as matrix, were optimize the extraction and clean-up, and the chromatographic conditions were defined. The optimized conditions were as followed: derivation with lyophilized CAP and at low humidity conditions, the silanization reaction of CAP must be conducted for 15 minutes at 80 °C; the best purification conditions were obtained by hexane washes and SPE-C18 cleaning; in the optimization of chromatography conditions went determinated wich the splitless must be done with a liner of 2 mm with split valve opening at 0.5 min; it should be used an 60 m DB1 column to reach a higher efficiency at temperature conditions as follow: 90 °C / 1 min heating 60 °C / min until 200 °C / 7 min, raising 5 °C / min until 230 °C / 3 min heating 5 °C / min until 260 °C / 35.17 min. The optimized conditions are not indicated for application at honey, pollen, shrimp, tilapia and ostrich meat due to the presence of co-eluates at these conditions. At the optimized conditions, the sheep meat, goat meat and goat milk matrix are indicated for development of studies for validation method for determination of CAP residues.

Keywords: chloramphenicol residues, food matrix, GC/ECD.

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos usados em animais representam sérios perigos e riscos de contaminação de origem alimentar. A monitoração de resíduos de antibióticos em alimentos é uma área de preocupação crescente e muito importante devido ao seu potencial impacto na saúde humana. Os antibióticos são administrados nos animais destinados a produção de alimentos, não só no tratamento de doenças, mas também subterapêuticamente para manter a saúde e promover o crescimento. O uso de antibióticos pode resultar na presença de resíduos nos produtos alimentares (CODEX ALIMENTARIUS, 1993). Por este motivo, a monitoração de resíduos de antibióticos em alimentos deve constituir um programa de vigilância permanente.

Na prática veterinária e/ou durante processamento de rações, cloranfenicol (CAP), embora proibido, é utilizado devido seu amplo espectro de ação e baixo custo contra bactérias infecciosas (KEUKENS *et al.*, 1986; AKHTAR *et al.*, 1995). A maioria dos relatos de uso de CAP para fins veterinários estão relacionados com cultivos de aquicultura e apicultura, porém esta prática pode se estender para diversos outros cultivos, tais como a caprinocultura, ovinocultura e criações de aves (ORTELLI *et al.*, 2004; WHO, 2004; CFIA, 2005; MARTINS JÚNIOR, 2006).

Na terapêutica humana, CAP só pode ser usado em casos graves de infecções por microorganismos resistentes a outras terapias menos danosas, tais como infecções por *Bacillus anthracis* e meningites causadas por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ou *Streptococcus pneumoniae*. O CAP em uma concentração plasmática de 25 µg/mL possui uma ação tóxica induzindo aplasia medular, o que a depender da dosagem e da duração do tratamento pode culminar em um quadro de anemia aplásica (MEDSCAPE, 2008). Além da ação tóxica direta do CAP à saúde humana, a indução de resistência bacteriana pelo seu uso indevido caracteriza mais um risco ao homem. Estudos descritos na literatura apontam que quando os agentes antimicrobianos são usados mais frequentemente em um ambiente, será maior a formação de cepas bacterianas resistentes à droga (TENDENCIA & PEÑA, 2001). Com isto, nota-se que o uso dos antibióticos de amplo espectro como o CAP, para fins veterinários deve ser evitado.

Portanto, diversos países proibiram o uso de CAP em animais que são destinados ou que geram produtos para a alimentação humana (ALOMIRAH, 2007). No Brasil, a Portaria 448/98 do MAPA proíbe o uso de CAP em animais destinados à alimentação humana (BRASIL, 1998). Na UE, EUA e Canadá o uso de CAP não é autorizado (FDA, 1997; COMMISSION REGULATION, 1998; CFIA, 2005). A Organização Mundial da Saúde também preconiza a não utilização (WHO, 2004). Os limites máximos de resíduos (LMR) de CAP estabelecidos pela UE, EUA e Brasil é zero (FDA, 1997; BRASIL, 1998; COMMISSION REGULATION, 1998; USFDA, 2002).

Para monitorar efetivamente a presença do resíduo, métodos analíticos específicos e com alta sensibilidade são necessários. Frequentemente, o nível de resíduo permitido está diretamente relacionado ao limite de detecção do método. Métodos que utilizam a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) detectam níveis de até 5,0 µg/kg (MAPA, 2002). Por Cromatografia Gasosa (CG) detectam-se níveis menores de 2,5 µg/kg (MAPA, 1999). Métodos que associam a cromatografia líquida com a técnica de espectrometria de massa-massa (CL/EM/EM) detectam valores de até 0,08 µg/kg (USFDA, 2003). A amostra precisa ser submetida a uma extração com solventes orgânicos, seguida de uma limpeza com coluna cromatográfica aberta, resultando em cromatogramas com boa resolução (HAAGSMA, *et al.*, 1986; KEUKENS *et al.*, 1986; AKHTAR *et al.*, 1995; PENA *et al.*, 1997; GAUDIN & MARIS, 2001).

A exigência de qualidade em países em desenvolvimento não consegue acompanhar a normalização dos foros internacionais: porque não têm estruturas técnicas e laboratoriais para realizar as análises; porque os custos envolvidos são extremamente altos; e porque o trabalho depende de mão-de-obra altamente especializada. Portanto metodologias alternativas para determinação de CAP, como por CG/DCE, são necessárias.

O objetivo deste estudo foi otimizar as condições de preparação das amostras de diferentes matrizes alimentícias de origem animal, assim como, as condições de separação cromatográficas por CG/DCE, para a determinação de resíduos de CAP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e Solventes

O padrão de CAP utilizado foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO 63103 USA). O acetato de etila, diclometano, hexano e ciclohexano utilizados foram grau pesticida da marca Mallinckrodt (Mallinckrodt Chemicals, USA). O metanol, acetonitrila e clorofórmio grau pesticida foram adquiridos da J.T.Baker (Mallinckrodt Baker, México). O cloreto de sódio (QUIMEX, Brasil) e o sulfato de sódio (VETEC, Brasil) utilizados foram grau p.a.. A água foi purificada usando um sistema Milli-Q (Millipore, USA). Os cartuchos SPE de sílica gel e C18 de 500 mg foram adquiridos da J. T. Baker. O reagente de silanização SIL-A (Trimetilclorosilano:Hexametildisilazano:Piridina; 1:3:9; v/v/v) foi obtido da Sigma-Aldrich.

2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: multiprocessador de alimentos Walita; balança analítica Shimadzu; agitador tipo vortex Phoenix; centrífuga refrigerada Eppendorf; banho-maria Fisatom; liofilizador Liobras; estufa com circulação de ar Nova Ética; cromatógrafo gasoso CP3800 Varian com detector de captura de elétrons (CG/DCE) com injetor *split/splitless*, a aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o software StarWorkstation versão 6.41; cromatógrafo gasoso Clarus 500 PerkinElmer com espectrômetro de massas (CG/EM) com injetor *split/splitless*, a aquisição e tratamento de dados foram realizados no software TurboMass versão 4.5.0 e na biblioteca NIST 98.

2.3. Procedimentos analíticos

As metodologias que foram utilizadas como base para a otimização do método de extração do resíduo de CAP para as matrizes camarão, mel, pólen, carnes de avestruz, tilápia, caprina, ovina e leite caprino foram as metodologias oficiais 203/01 e 203/03 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (para aves, bovinos, eqüinos e suínos) (Anexos I e II) que segue as normas do

MERCOSUL, *Codex Alimentarius* e USDA (USDA, 1991; CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994; USDA, 1998; MAPA, 1999; MAPA, 2002). A partir destas metodologias foram realizados ensaios com padrões e matrizes realizando alterações no método para obter as condições otimizadas.

Nos ensaios com padrões de CAP foram otimizadas as condições da reação de silanização (derivação) e as condições do *splitless*. Em ensaios com as matrizes foram obtidas as otimizações das etapas de partição e seletividade do método. O método inicialmente utilizado e os parâmetros avaliados estão descritos na figura 1.

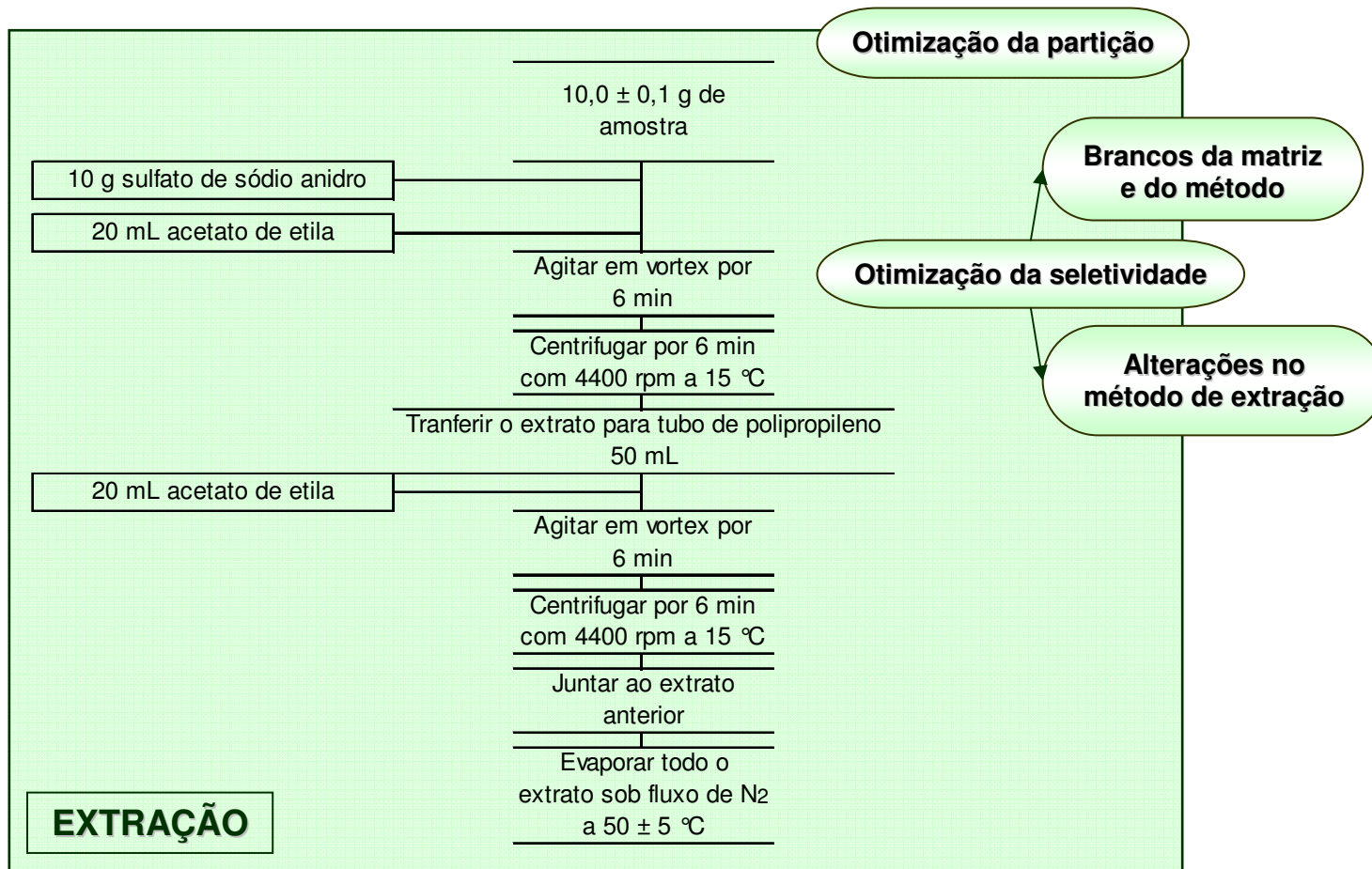


Figura 1. Fluxograma do método inicialmente utilizado para a otimização das condições de extração, purificação, derivação e cromatográficas (Destaque: Parâmetros otimizados).

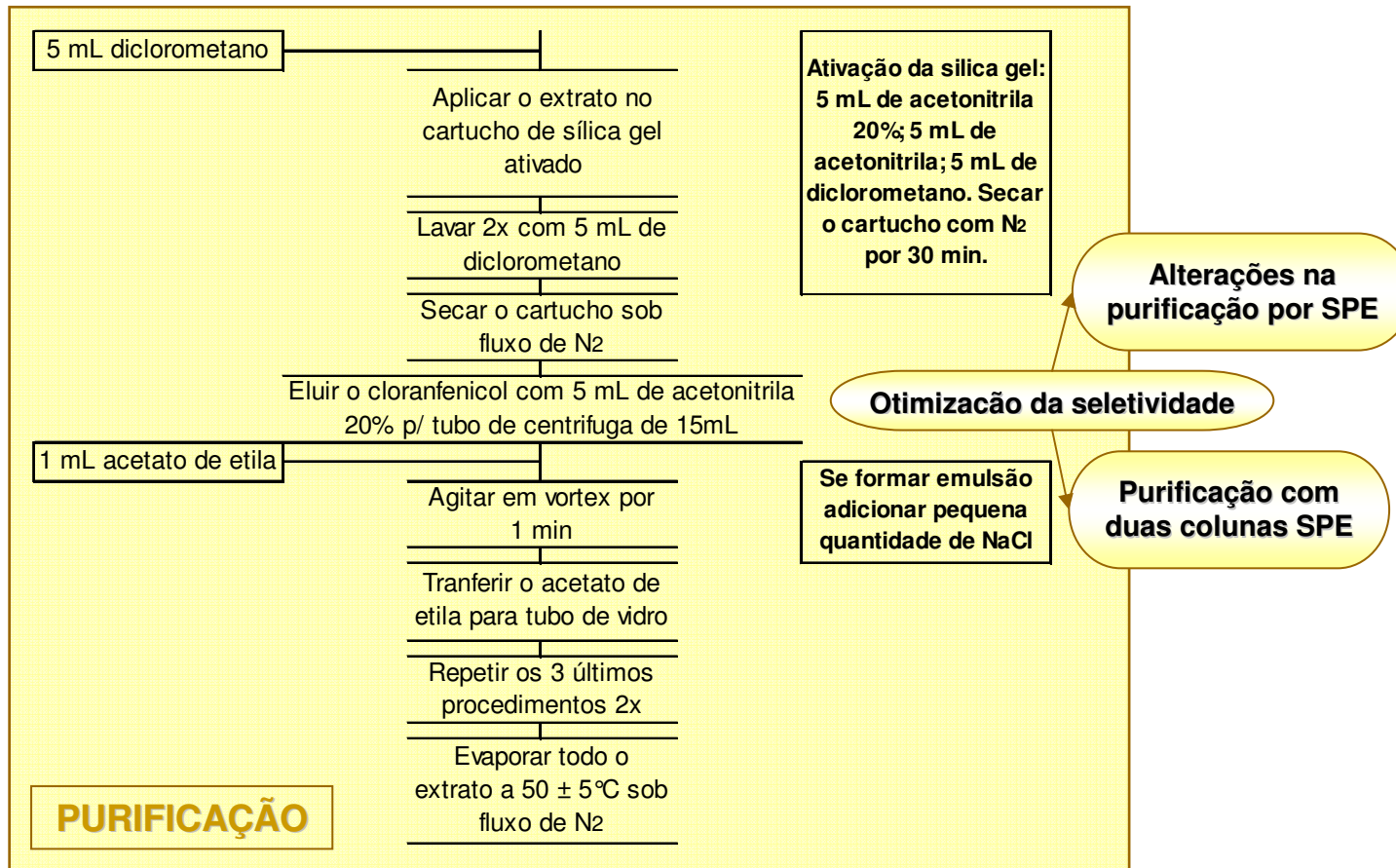


Figura 1. Fluxograma do método inicialmente utilizado para a otimização das condições de extração, purificação, derivação e cromatográficas (Destaque: Parâmetros otimizados) (continuação).

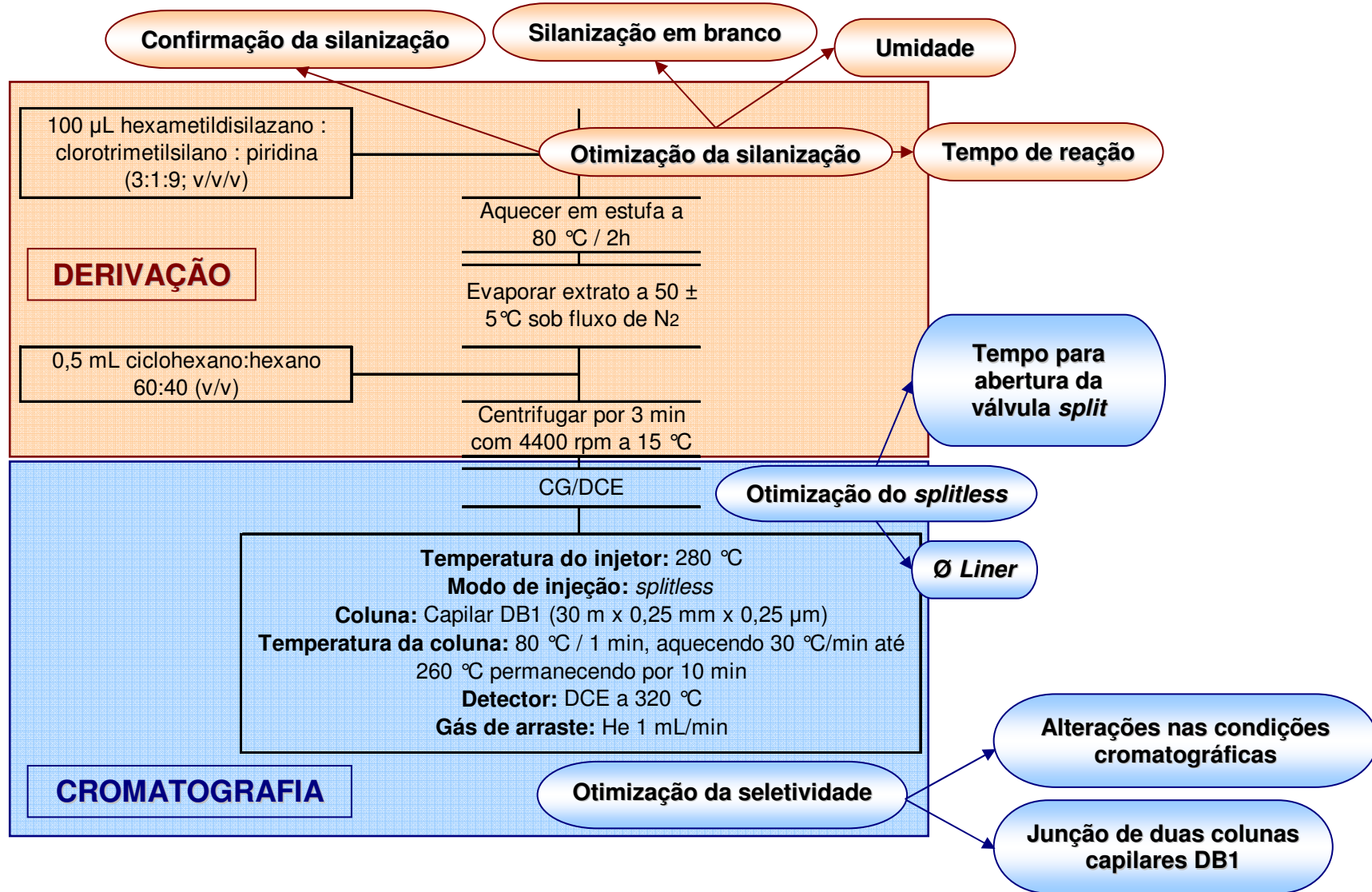


Figura 1. Fluxograma do método inicialmente utilizado para a otimização das condições de extração, purificação, derivação e cromatográficas (Destaque: Parâmetros otimizados) (continuação).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio com o padrão de CAP

3.1.1. Otimização da reação de silanização

A reação de silanização do CAP foi realizada em diferentes condições e o monitoramento da derivação foi realizado através da separação e identificação por CG/EM para confirmar a derivação do analito. Depois de otimizadas as condições da reação, as condições de separação, identificação e quantificação de CAP silanizado foram otimizadas através da utilização do CG/DCE.

Em um primeiro ensaio, para a otimização da reação de silanização, foi pesado em um vial âmbar uma massa de 1,5 mg do padrão de CAP e adicionados 100 μ L do reagente de silanização Sigma Sil-A. A reação de silanização se processou a 80 °C em estufa com circulação de ar por 2 h, seguindo o procedimento descrito por DRUZIAN (2000). Após a derivação, o CAP silanizado foi seco sob fluxo brando de N₂ a 50 \pm 5 °C e dissolvido em 0,5 mL de hexano, obtendo-se um extrato na concentração de 3 mg/mL do CAP silanizado. Este extrato foi agitado por 1 min em vortex e centrifugado a 4400 rpm a 15 °C por 3 min. O extrato foi armazenado sob atmosfera inerte de N₂ a -18 °C e protegido da luz até o momento da análise. As condições cromatográficas utilizadas no CG/EM foram: injetado 1 μ L do CAP silanizado no modo de injeção *splitless* com o injetor na temperatura de 280 °C. A separação foi realizada com coluna capilar Elite 5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) sob as seguintes condições de temperatura: 80 °C durante 1 min aumentando sob taxa de 20 °C / min até 260 °C permanecendo por 10 min, aquecendo 40 °C / min até 280 °C permanecendo nesta temperatura por 19,5 min, totalizando 40 min de corrida. O gás de arraste utilizado foi Hélio sob um fluxo de 1 mL / min. A fragmentação das moléculas foi obtida por ionização por impacto de elétrons (do inglês, *Electron Impact* – EI) com energia de 70 eV. O espectrômetro de massas foi programado para varredura na faixa de 45 a 550 m/z. As temperaturas da linha de transferência e fonte de ionização foram, respectivamente, 200 e 180 °C. Pela a análise cromatográfica realizada

constatou-se que ocorreu a derivação do CAP (Figura 2A), obtendo-se o cromatograma do padrão derivado sendo que o CAP silanizado (Figura 2B) foi identificado por comparação do espectro de massas obtido com o espectro de massas da biblioteca NIST 98. Com isso, foi identificado o O,O-Bis-(Tri-Metil-Silil)-Cloranfenicol (Figura 2B) no Tr de 19,6 min (Figura 3). Porém, o pico obtido apresentou uma pequena área (Área = 20068920). Como possíveis causas suspeitaram-se: primeiro, o reagente de silanização não estaria em quantidades equimoleculares a de CAP possibilitando que apenas parte da massa do analito sofresse derivação; em segundo, o CAP silanizado pode ter baixa solubilidade em hexano, uma vez que a metodologia do MAPA (1999) relata que o CAP silanizado deve ser dissolvido na mistura ciclohexano:hexano (60:40, v/v).

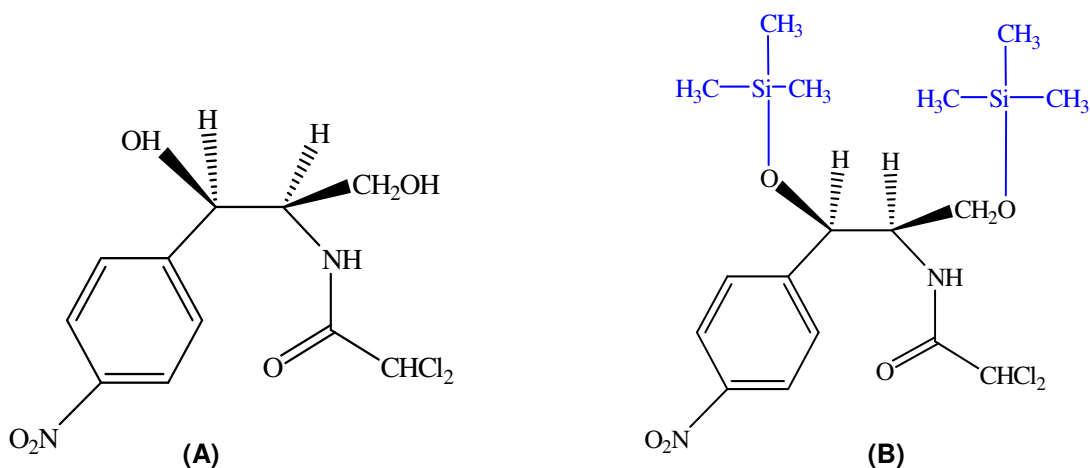


Figura 2. (A) CAP; (B) CAP Silanizado.

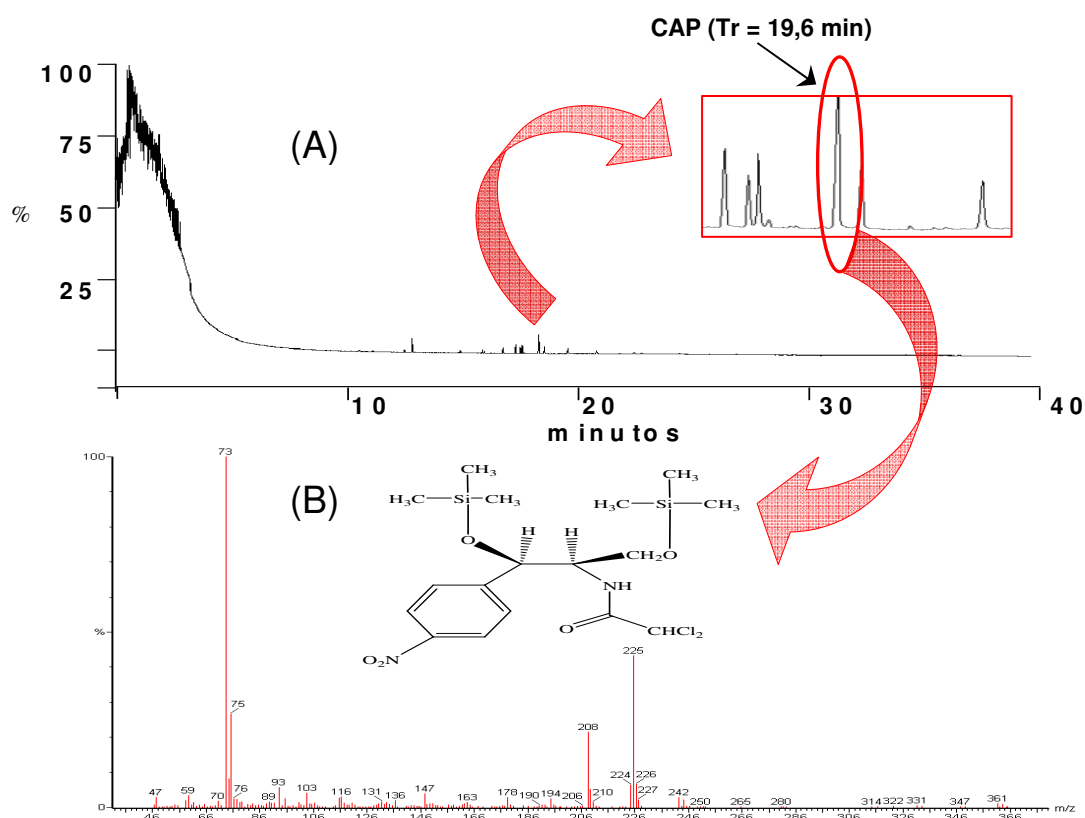


Figura 3. (A) Cromatograma CG/EM da solução padrão de 3 mg/mL do CAP obtido pela silanização com 100 μ L de Sigma Sil-A (Destaque: CAP no Tr de 19,6 min); **(B)** Espectro de massas obtido do pico do CAP silanizado (Destaque: estrutura do CAP Bis-silanizado).

Segundo as instruções de uso do reagente SIGMA SIL-A fornecidas pelo fabricante, a proporção do mesmo deve ser de no mínimo 100 μ L do reagente para cada miligrama do analito, sendo que o tempo e a temperatura de reação podem variar de acordo com cada analito (SIGMA, 2005). Portanto no teste seguinte, utilizou-se a mesma massa de CAP (1,5 mg) com o reagente de silanização em excesso (500 μ L) mantendo-se fixas as outras condições. Este ensaio resultou em um cromatograma do CAP Bis-Silanizado (Figura 4) com um moderado aumento na área do pico (Área = 21170150) quando comparado ao cromatograma da figura 3 (Área = 20068920).

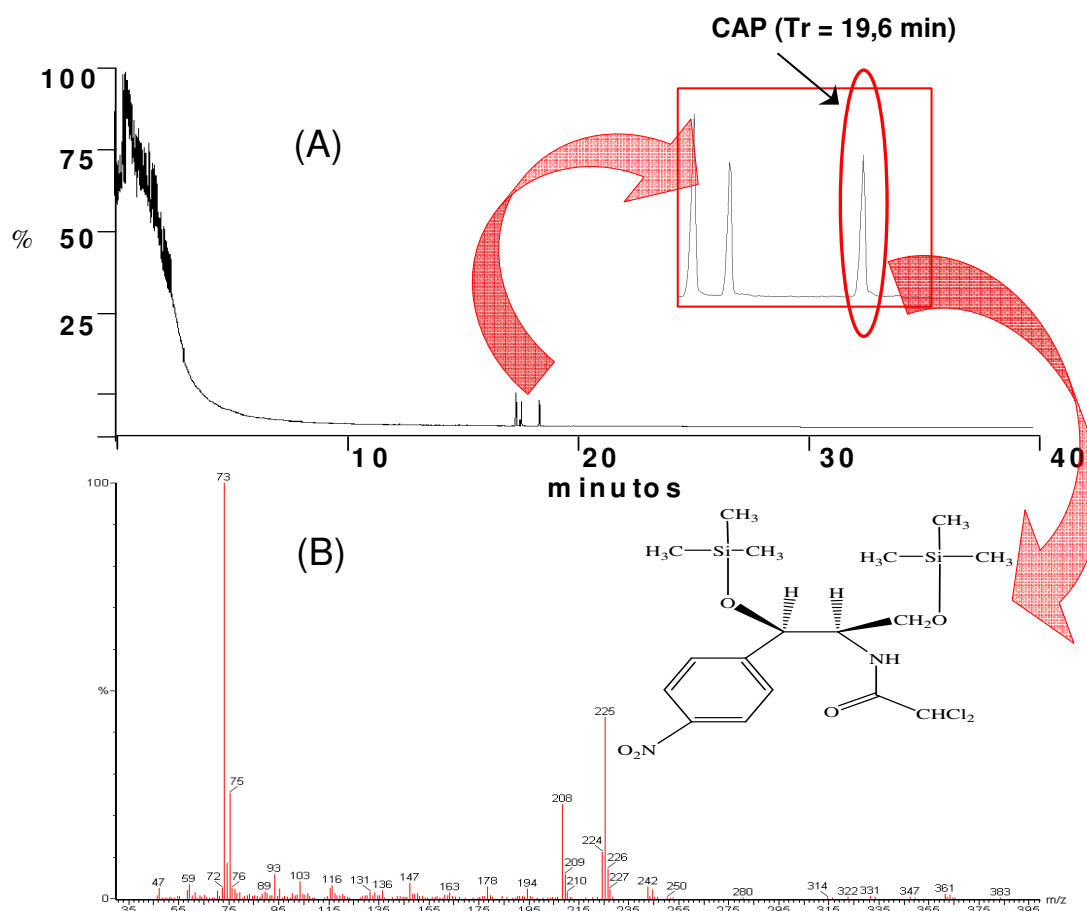


Figura 4. (A) Cromatograma CG/EM da solução padrão de 3 mg/mL do CAP obtido pela silanização com 500 μ L de Sigma Sil-A (Destaque: CAP no Tr de 19,6 min); **(B)** Espectro de massas obtido do pico do CAP silanizado (Destaque: estrutura do CAP Bis-silanizado).

Tendo-se confirmada a silanização do CAP por meio dos espectros de massas, prosseguiu-se com os testes para otimizar a silanização utilizando-se o CG/DCE, por este ser mais sensível que o CG/EM.

Foi realizada uma nova derivação utilizando CAP na mesma concentração (3 mg/mL) e nas mesmas condições definidas nos testes por CG/MS, porém o CAP silanizado resultante foi diluído na mistura ciclohexano:hexano (60:40; v/v) conforme o indicado pelo método do MAPA (1999). As condições cromatográficas utilizadas no CG/DCE foram: injetado 1 μ L do CAP silanizado no modo de injeção *splitless*; a separação foi realizada com coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) sob as seguintes condições de temperatura: 80 $^{\circ}$ C durante 1 min aumentando sob taxa de 30 $^{\circ}$ C/min até 230 $^{\circ}$ C permanecendo por 44 min, totalizando 50 min de corrida. O gás de arraste

utilizado foi Hélio sob um fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 280 e 320 °C. O cromatograma obtido resultou numa baixa resolução, devido à alta concentração do analito, conforme evidenciado pela figura 5.

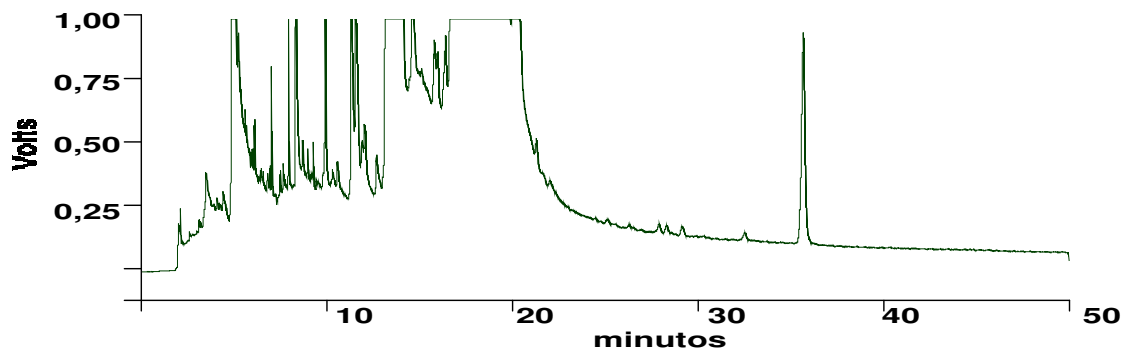


Figura 5. Cromatograma CG/DCE de CAP silanizado na concentração de 3 mg/mL.

O detector de captura de elétrons (DCE) possui uma alta seletividade e sensibilidade para compostos de alta eletronegatividade, em especial para os halogenados (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al*, 1995; SKOOG *et al*, 2002; AQUINO & NUNES, 2003; CECCHI, 2003). Os detectores, em geral, possuem uma faixa linear de resposta que determina sua capacidade de gerar um sinal diretamente proporcional à concentração do analito. Nesta faixa existe um valor máximo e um valor mínimo onde se pode quantificar o componente (RIBANI *et al*, 2004). Considerando-se as características de sensibilidade e linearidade de resposta do DCE e pela interpretação do cromatograma obtido (Figura 5) foi concluído que o analito estava muito concentrado, ultrapassando a escala máxima de 1 V deste detector. Com isso, foram testadas diluições consecutivas da solução de 3 mg/mL de CAP silanizado, seguida da injeção no CG/DCE até obter um cromatograma com picos separados com boa resolução e dentro da faixa linear do detector. Nestas injeções foi constatado que nenhum pico eluiu após 35 min de corrida, por isso o tempo total de corrida foi reduzido diminuindo-se o tempo de permanência na temperatura de 230 °C de 44 para 30 min, totalizando 36 min de corrida. Isto resultou no cromatograma da figura 6A do CAP silanizado na concentração de 4 µg/mL. Para determinar o Tr do CAP silanizado no cromatograma obtido foi realizada uma reação de silanização em branco (sem a adição de CAP) usando como diluente a mistura ciclohexano : hexano (60:40, v/v) (Figura 6B). Observa-se pela comparação

dos cromatogramas A e B que o único pico ausente no cromatograma B possui um Tr de aproximadamente 17 min, sendo assim foi determinado que este pico corresponde ao CAP silanizado, e que não existem co-eluentes oriundos do reagente de silanização neste Tr.

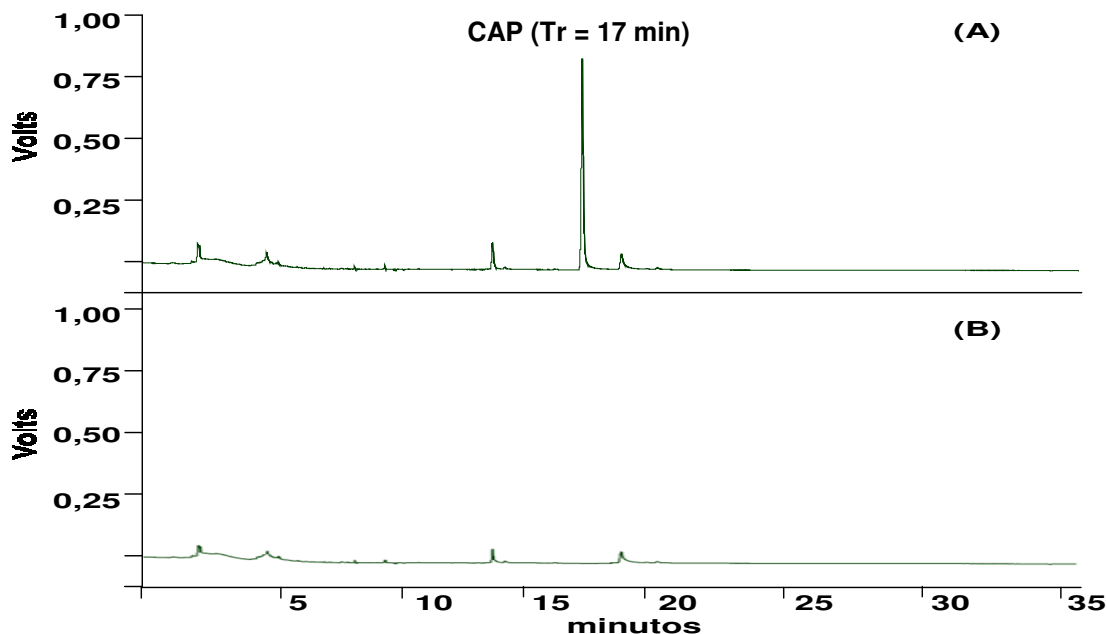


Figura 6. Cromatogramas obtidos por CG/DCE: **(A)** Cromatograma da solução CAP silanizado de 4 $\mu\text{g/mL}$; **(B)** Cromatograma da silanização em branco (sem adição de CAP).

O processo de derivação é sensível a umidade, podendo acarretar em perda de rendimento da reação devido à degradação do reagente de silanização pela reação de hidrólise (SUPELCO, 1997; SIGMA, 2005). Devido a isto, foram realizados dois testes para avaliar o rendimento da reação:

1. Foi determinada a área do pico do CAP silanizado nas condições já definidas e pela injeção de 1 μL uma solução de concentração de 0,4 $\mu\text{g/L}$ no CG/DCE (Figura 7A).
2. As condições de derivação foram modificadas visando reduzir a umidade: antes da derivação o padrão de CAP foi liofilizado por 24h; todo o material utilizado na derivação foi mantido sob atmosfera de baixa umidade (dessecador com sílica). Após a reação de silanização nestas novas condições, foi injetado 1 μL da solução de concentração de 0,4 $\mu\text{g/L}$ no CG/DCE (Figura 7B).

No cromatograma obtido pelo primeiro procedimento não houve a detecção do CAP silanizado (Figura 7A), porém no procedimento que utilizou o CAP com liofilização prévia a silanização houve a detecção do pico do CAP silanizado (Figura 7B). Isto demonstra que a umidade reduz o rendimento da reação de silanização. Devido a isto, para a obtenção da curva padrão externo foi adotado o uso de CAP liofilizado para a reação de silanização.

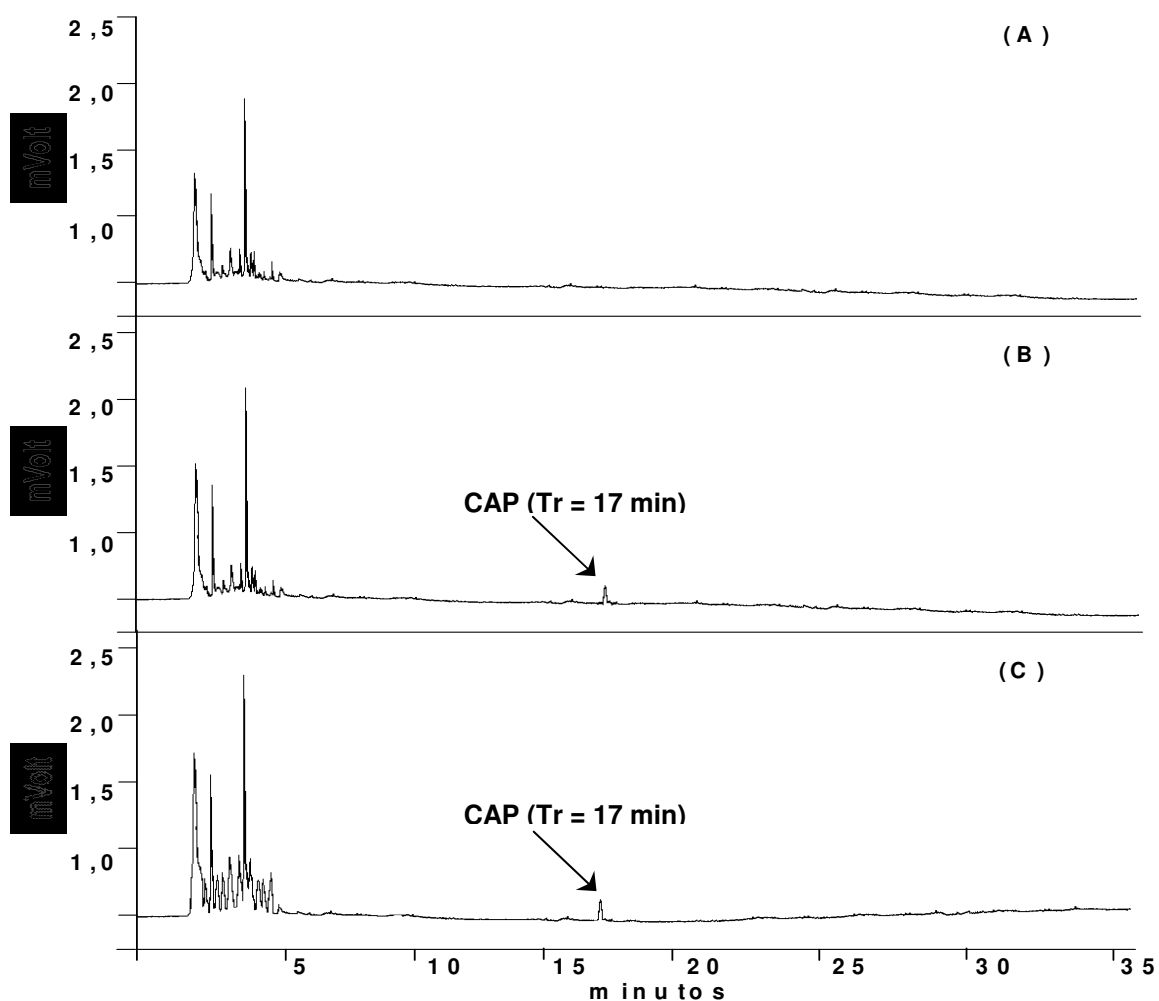


Figura 7. Cromatogramas CG/DCE de CAP a 0,4 µg/L em diferentes condições: **(A)** CAP não liofilizado e silanizado por 2 h (não detectou CAP); **(B)** CAP liofilizado e silanizado por 2 h; **(C)** CAP liofilizado e silanizado durante 15 min.

O tempo de derivação inicialmente adotado foi de 2 h conforme o descrito por DRUZIAN (2000) para garantir total silanização do CAP. O método descrito pelo MAPA (1999) para análise de resíduos de CAP em músculo por CG/DCE utiliza um tempo de silanização de 15 min em amostras fortificadas com até 3 µg/kg de CAP. Devido a isto foi avaliada a redução do tempo de silanização do CAP de 2 h para 15 min para verificar se o rendimento da reação seria

equivalente nas duas condições de tempo de reação. Comparando-se as áreas obtidas para os picos de soluções de 0,4 µg/L de CAP liofilizado silanizado em 2 h (Figura 7B) (área_{2h} = 1224) e de CAP liofilizado silanizado em 15 min (área_{15 min} = 1400) (Figura 7C), constata-se maior rendimento no menor tempo de silanização. Portanto, a silanização em 15 min foi adotada em todos os próximos procedimentos.

3.1.2. Otimização do *Splitless*

A técnica de *splitless* é utilizada para análises onde o analito está presente em baixas concentrações. Neste modo de injeção o analito é concentrado no início da coluna, sendo eliminada a maior parte do solvente pela abertura em determinado momento da válvula *split* do injetor (Figura 8) (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al*, 1995; CECCHI, 2003).

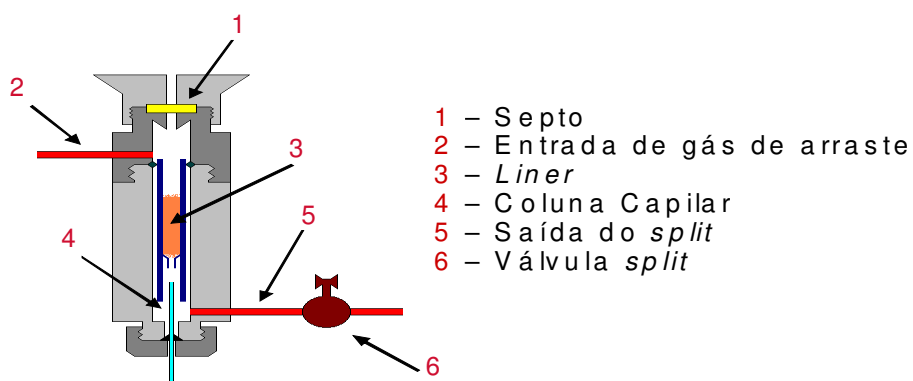


Figura 8. Esquema simplificado de um injetor *split/splitless*.

O processo de injeção *splitless* influencia diretamente a área do pico do analito de interesse, que por sua vez está diretamente relacionada com a concentração do analito. A otimização da injeção *splitless* pode ser obtida avaliando-se alguns parâmetros, tais como: a temperatura do injetor, diâmetro do *liner*, temperatura inicial da coluna e a vazão e o tempo para abertura da válvula *split*. O método do MAPA (1999) indica uma temperatura do injetor de 280 °C, temperatura inicial da coluna de 80 °C e uma vazão da válvula *split* de 50 mL/min, porém o mesmo não informa o diâmetro do *liner* utilizado e o tempo para abertura da válvula *split*. Devido a isto, foram avaliados dois tipos de *liners*

e o tempo para a abertura da válvula *split* para otimizar a injeção *splitless* (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros avaliados na otimização do *splitless*.

Variáveis avaliadas	Solução de CAP silanizado ($\mu\text{g/L}$)	Volume de injeção (μL)
Diâmetro do <i>Liner</i> (mm)	2,0	5,0
	4,0	
Tempo para abertura da válvula <i>split</i> (min)	0,25	1,0
	0,50	1,0
	0,75	1,0

Para avaliar a influência do liner foram realizadas injeções ($n=3$) de $1\ \mu\text{L}$ do padrão de $5\ \mu\text{g/L}$ de CAP silanizado utilizando os dois *liners* de diâmetros diferentes. Pela análise dos cromatogramas obtidos (Figura 9A e B) e pelo gráfico na figura 10, pode-se observar que a área do pico de CAP silanizado obtido no ensaio com o *liner* de 2 mm ($\text{área}_{\text{média}} \pm \text{CV} = 20844 \pm 0,94$) foi cerca de 2,6 vezes maior que a área obtida pelo ensaio com o *liner* de 4 mm ($\text{área}_{\text{média}} \pm \text{CV} = 7985 \pm 0,90$).

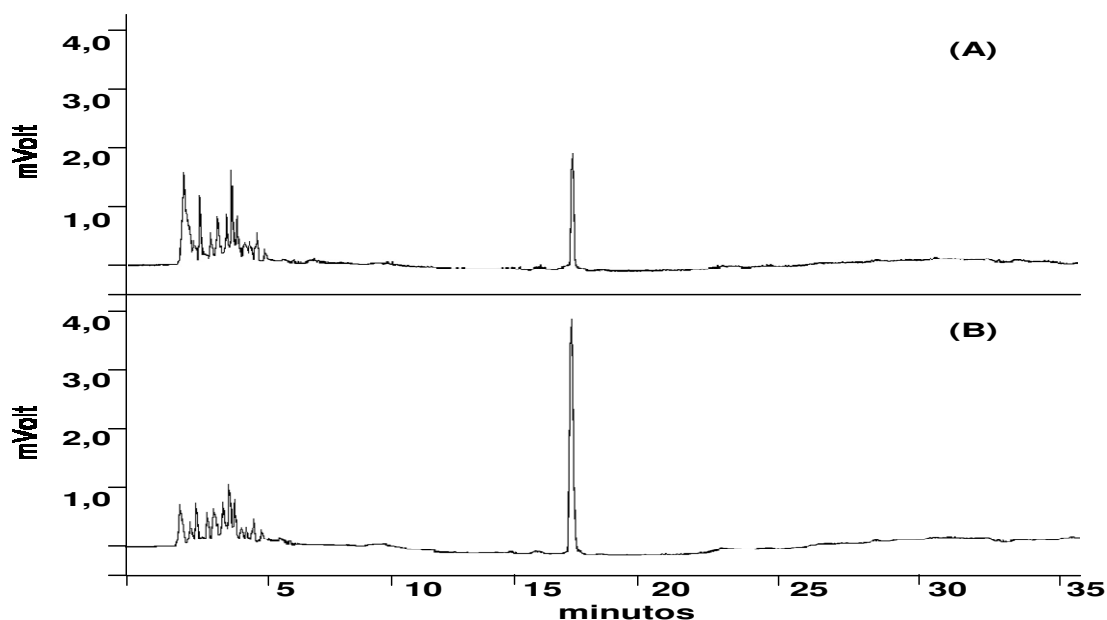


Figura 9. Cromatogramas da solução de $5\ \mu\text{g/L}$ de CAP liofilizado silanizado durante 15 min: **(A)** Injeção de $1\ \mu\text{L}$ utilizando um *liner* de 4 mm de diâmetro interno; **(B)** Injeção de $1\ \mu\text{L}$ utilizando um *liner* de 2 mm de diâmetro interno.

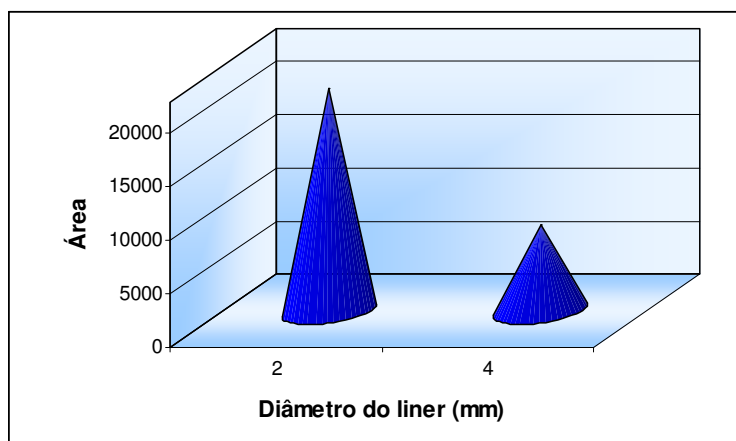


Figura 10. Gráfico comparativo das áreas dos picos de CAP silanizado obtidas por CG/DCE utilizando modo de injeção *splitless* com *liners* de 2 e 4 mm.

A redução do diâmetro do *liner* reduz o seu volume interno, com isso a dispersão do vapor do analito foi menor, facilitando a concentração do mesmo no início da coluna e, conseqüentemente, aumentou a eficiência do *splitless*. Por isso, foi adotado o *liner* de 2 mm para os procedimentos seguintes.

Para avaliar o tempo para abertura da válvula *split* foram realizadas injeções (n=3) de 1 μ L do padrão de 1 μ g/L de CAP silanizado com os tempos de 0,25, 0,50 e 0,75 min para a abertura da válvula *split*. Os resultados obtidos demonstraram uma variação muito pequena nas áreas obtidas, conforme pode ser observado nas figuras 11 e 12.

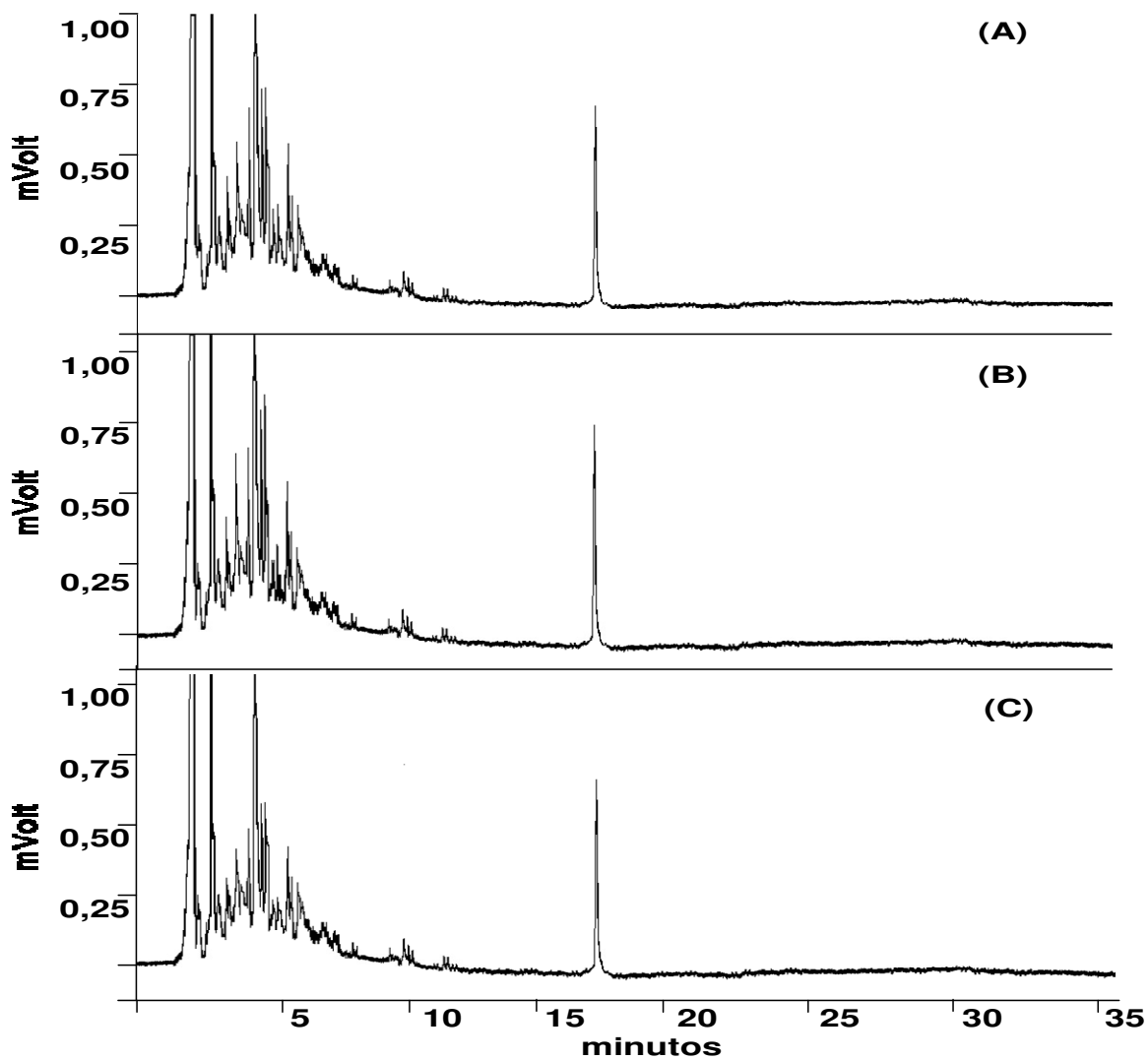


Figura 11. Cromatogramas da solução de 1 $\mu\text{g/L}$ de CAP liofilizado silanizado durante 15 min: **(A)** Injeção de 1 μL com abertura da válvula *split* em 0,25 min; **(B)** Injeção de 1 μL com abertura da válvula *split* em 0,50 min; **(C)** Injeção de 1 μL com abertura da válvula *split* em 0,75 min.

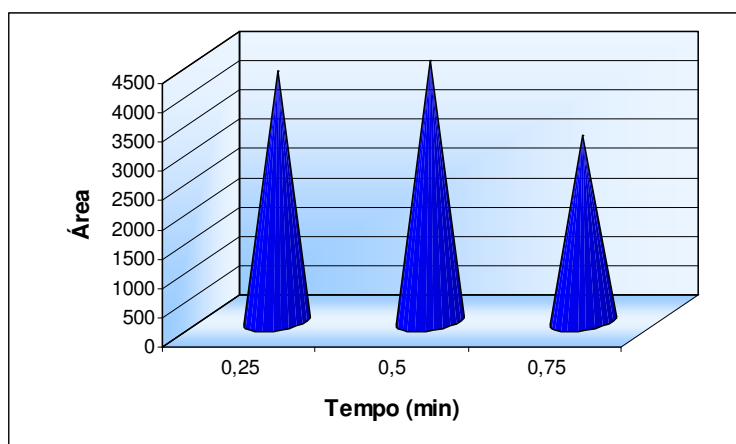


Figura 12. Gráfico comparativo das áreas dos picos de CAP silanizado obtidas por CG/DCE utilizando modo de injeção *splitless* com diferentes tempos para abertura da válvula *split*.

Isto demonstra que o tempo para a abertura da válvula *split* de 0,25 e 0,50 min ($\text{área}_{\text{média}} \pm \text{CV} = 4241 \pm 1,04$ e $4426 \pm 0,76$, respectivamente) não exerceu grande influência sobre as áreas dos picos. Porém para o tempo do *splitless* de 0,75 min ($\text{área}_{\text{média}} \pm \text{CV} = 3160 \pm 0,89$) obteve-se uma pequena redução da área do pico do CAP silanizado. Portanto, o tempo de 0,5 min foi o que resultou em uma área ligeiramente maior, e foi adotado como tempo ideal para os próximos procedimentos.

Portanto, as condições definidas para o *splitless* foram: uso de um *liner* de 2 mm de diâmetro e abertura da válvula *split* em 0,50 min. Estes parâmetros foram adotados para todos os ensaios seguintes.

3.2. Testes com matrizes

Após a otimização das condições de silanização e de separação cromatográfica para alcançar uma maior sensibilidade do CG/DCE, foram iniciados os ensaios com as matrizes. Para as análises com as matrizes não foi adotado o procedimento da liofilização prévio a silanização, devido este aumentar muito o tempo de análise. Neste caso a diminuição de rendimento pela hidrólise foi avaliada pelos ensaios de validação que mediram a exatidão do método.

3.2.1. Otimização da etapa da partição para extração de CAP das matrizes camarão, mel e pólen

3.2.1.1. Camarão

As amostras de camarão utilizadas foram doadas pela Fazenda Oruabo da BAHIA PESCA S/A, empresa vinculada à Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. A espécie de camarão *Litopenaeus vannamei* foi cultivada na fazenda sem o uso de antimicrobianos.

Foram avaliados dois tipos de processamentos para a matriz camarão: primeiramente, a amostra foi processada retirando-se o encefalotórax e todo o exoesqueleto, moendo-se apenas o músculo do camarão. Na etapa inicial da partição com acetato de etila para a extração do CAP da a matriz, o músculo

de camarão moído adquiriu uma consistência de goma o que dificultou a interação entre as fases e a recuperação de todo o volume do solvente extrator adicionado (duas frações de 20 mL). A recuperação do volume de solvente extrator adicionado é essencial para garantir a exatidão do método. Devido a isto, foi testada a trituração do camarão inteiro, sem a retirada do encefalotórax e exoesqueleto. Neste caso, o camarão moído inteiro adquiriu uma consistência mais pastosa e no procedimento de extração com o acetato de etila, o camarão não formou a goma e a separação das fases foi efetiva e rápida. Com isso, o processamento do camarão inteiro foi adotado como padrão para os ensaios com esta matriz.

Portanto, as amostras de camarão inteiro foram identificadas e registradas, depois de moídas com o auxílio de um multiprocessador de alimentos, seguidas de acondicionamento em recipiente de vidro, devidamente rotulado, hermeticamente fechado e, por fim, armazenadas sobre temperatura de congelamento (- 18 °C) até o momento da análise, conforme descrito em CODEX ALIMENTARIUS (1993) e MERCOSUL (1994).

3.2.1.2. Mel e Pólen

As matrizes apícolas utilizadas, mel e pólen, foram doadas pelo Apiário do Campus II da Universidade Estadual da Bahia – UNEB, localizado na cidade de Alagoinhas/BA. O apiário da UNEB mantém o seu cultivo na fazenda sem o uso de antimicrobianos. A matriz pólen foi moída com o auxílio de multiprocessador e acondicionada em recipiente hermeticamente fechado. As amostras de mel e pólen foram identificadas, registradas e armazenadas sobre temperatura de refrigeração até o momento da análise.

Para as matrizes apícolas, na etapa de partição com o acetato de etila também houve a formação de uma massa com consistência de goma que dificultou a separação das fases e a recuperação do solvente extrator. Devido a isso foram realizadas modificações nas etapas iniciais do método visando melhorar a partição. As alterações testadas foram adições de diferentes volumes de água (de 0,5 mL a 10 mL) na massa da amostra para dissolver a goma formada e promover a partição entre as fases. Os testes foram realizados até se conseguir a completa dissolução da goma, promovendo maior

interação entre a amostra e o solvente extrator (acetato de etila), e a recuperação de todo o volume de acetato adicionado (duas frações de 20 mL).

Com isso, conseguiram-se as condições otimizadas para a etapa de partição do mel e do pólen, descritas abaixo:

Mel:

- A massa de mel pesada ($10 \pm 0,1$ g) foi diluída em 6 mL de água.
- Adicionar 10 g de sulfato de sódio e homogeneizou-se essa mistura.
- Adicionar a primeira fração de 20 mL do acetato de etila e agitação em vortex por 6 min.
- Centrifugar três vezes durante 6 min a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 4400 rpm. Entre as centrifugações quebrar a emulsão formada com agitação manual branda.
- Transferir a fase apolar (acetato de etila) para um tubo de polipropileno de 50 mL.
- Adicionar a segunda fração de 20 mL de acetato de etila e repetir os procedimentos de agitação e centrifugação.
- Prosseguir o método de extração a partir da secagem do acetato de etila.

Pólen:

- Na massa de pólen pesada ($10 \pm 0,1$ g) foram adicionados 2 mL de água e homogeneizada a mistura.
- Adicionar 10 g de sulfato de sódio e a primeira fração de 20 mL do acetato de etila.
- Prosseguir o método de extração a partir da primeira agitação em vortex por 6 min após a adição do acetato de etila.

3.2.2. Avaliação da seletividade nas matrizes camarão, mel e pólen

A seletividade corresponde ao grau de interferência de outros compostos, como outro analito, reagentes, impurezas e produtos de degradação, assim como da matriz garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples, isto é, que não existam interferentes (co-eluentes) naquele tempo de retenção (BRASIL, 2003; RIBANI *et al*, 2004).

Para a avaliação da seletividade foram realizados ensaios com as matrizes camarão, mel e pólen isentas de CAP, para garantir que não existe nenhum co-eluyente no mesmo Tr do CAP.

Nesta etapa constatou-se a presença de co-eluentes o que determinou a necessidade de realizar modificações no método na tentativa de retirar e/ou separar estes interferentes do CAP.

3.2.2.1. Camarão

Os ensaios com a matriz camarão foram realizados de acordo com método descrito no fluxograma da figura 13. As condições cromatográficas utilizadas no CG/DCE foram: injeção de 1 μ L no modo *splitless* com *liner* de 2 mm e o tempo de 0,5 min para a abertura da válvula *split* conforme os dados obtidos na otimização no *splitless* nos ensaios com padrões; a separação foi realizada com coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) sob as seguintes condições de temperatura: 80 °C durante 1 min aumentando sob taxa de 30 °C/min até 230 °C permanecendo por 14 min, totalizando 20 min de corrida. O gás de arraste utilizado foi Hélio sob um fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 280 e 320 °C. Nos ensaios com padrões e alguns testes com a amostra camarão foi constatado que nestas condições nenhum pico eluia após 18 min de corrida, por isso o tempo total de corrida foi reduzido diminuindo-se o tempo de permanência na temperatura de 230 °C de 30 para 14 min, totalizando 20 min de corrida.

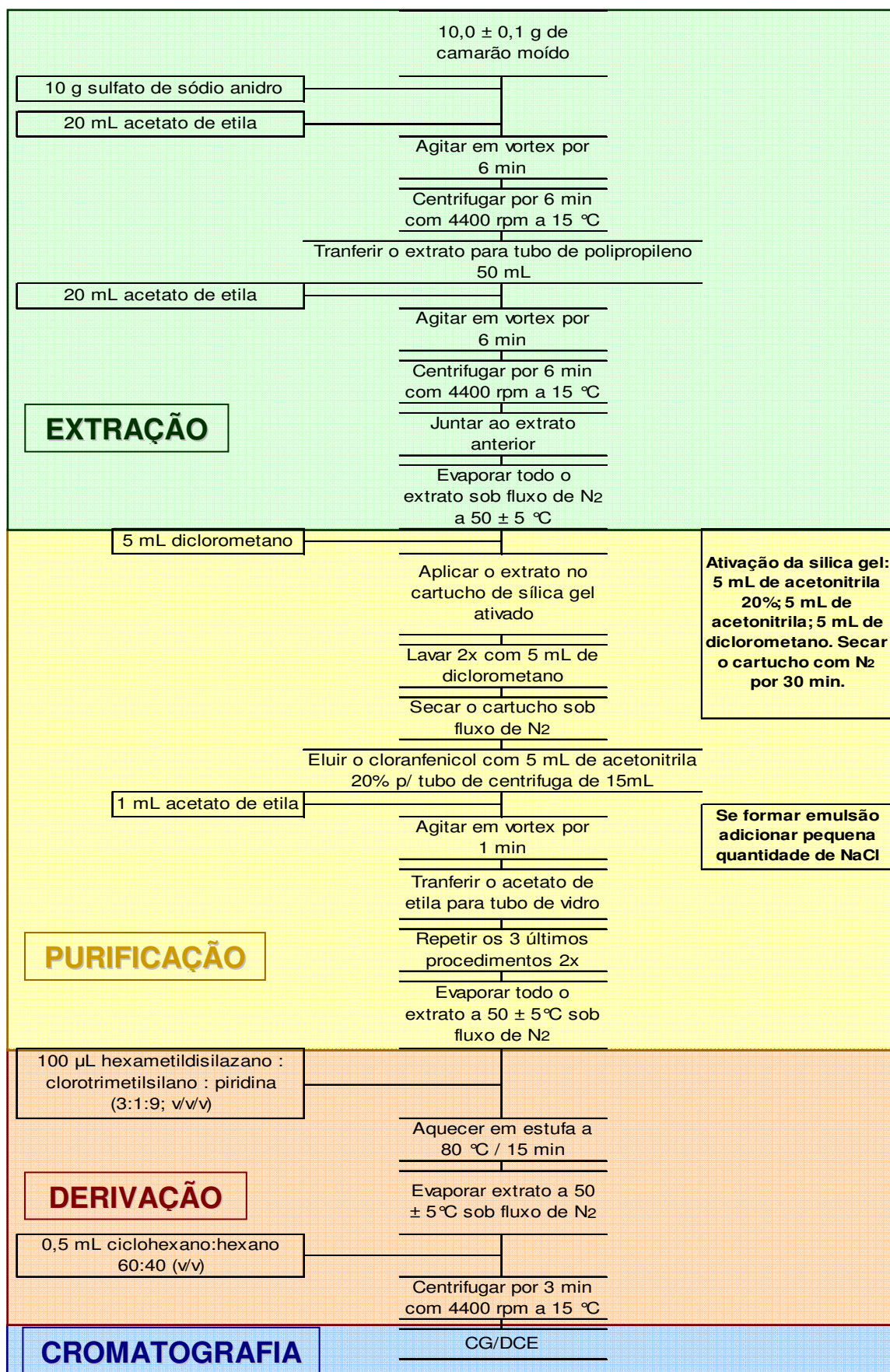


Figura 13. Fluxograma do primeiro método utilizado para a determinação de resíduos de CAP na matriz camarão.

Nestas condições obteve-se o cromatograma da figura 14A com a presença de um pico no mesmo Tr do CAP silanizado (17 min) (Figura 7). O camarão utilizado foi cultivado sem o uso de antibióticos, logo o pico detectado no mesmo Tr do CAP foi identificado como sendo um co-elute. Para garantir que o pico do co-elute não foi originado do próprio método, foi realizada uma extração sem a adição da matriz, apenas utilizando os reagentes e solventes do procedimento. Esta análise resultou no cromatograma da figura 14B constatando-se que o co-elute não se origina do método e sim da matriz.

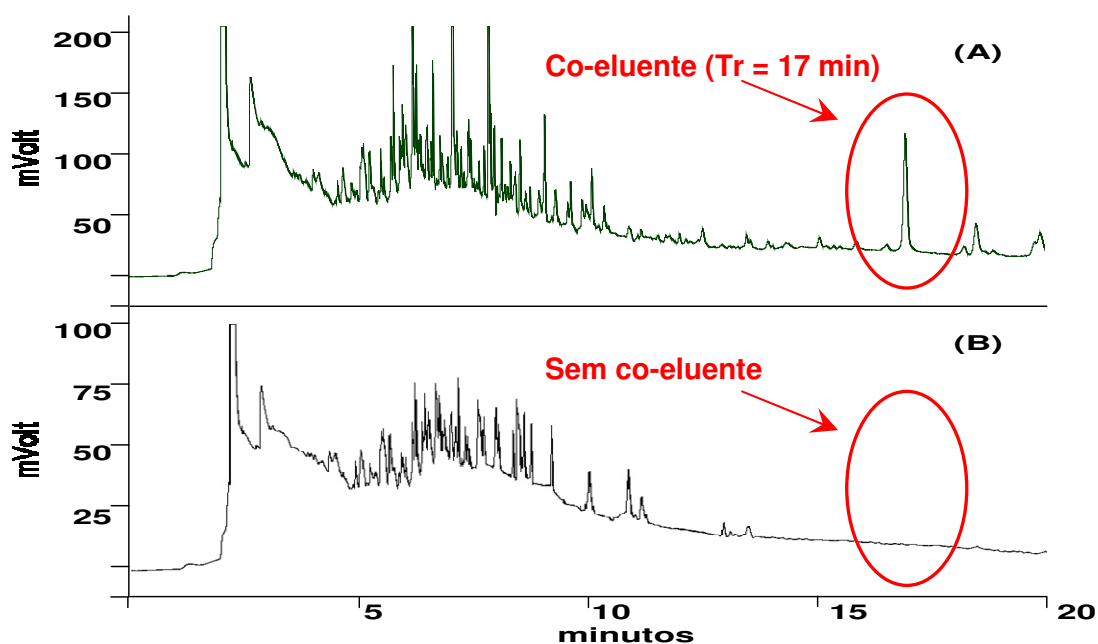


Figura 14. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método descrito na figura 13: **(A)** Matriz camarão com a presença de co-elute; **(B)** Extração sem a adição de amostra mostrando que o co-elute é originado da matriz.

Foi avaliada a presença de co-eluentes da matriz utilizando o CG/EM. Para este ensaio o extrato foi concentrado de 0,5 mL para 0,1 mL e injetado no CG/EM sob as mesmas condições cromatográficas do CG/DCE. A fragmentação das moléculas foi obtida por ionização por impacto de elétrons (do inglês, *Electron Impact* – EI) com energia de 70 eV. O espectrômetro de massas foi programado para varredura na faixa de 50 a 550 m/z. As temperaturas da linha de transferência e fonte de ionização foram, respectivamente, 200 e 180 °C.

Nas condições utilizadas na análise pelo CG/EM o Tr do CAP foi de 13,5 min (Figura 15A), a identificação foi confirmada pela comparação entre o

espectro de massas obtido com o espectro da biblioteca NIST. Pela injeção do extrato concentrado do camarão foi novamente constatada a presença do co-eluyente (Figura 15B) no mesmo Tr do CAP.

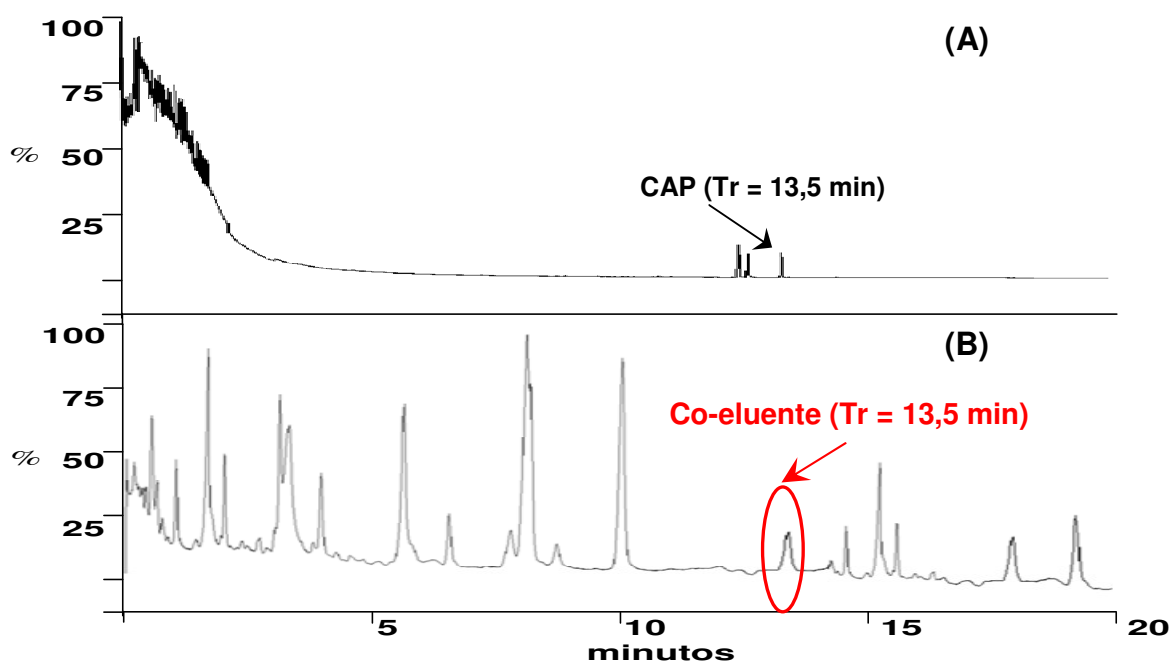


Figura 15. Cromatogramas obtidos pelo CG/EM: **(A)** Solução padrão de 3 mg/mL do CAP silanizado (CAP no Tr de 13,5 min); **(B)** Extrato concentrado da matriz camarão, destacando presença de co-eluyente no Tr do CAP.

Para identificar qual o co-eluyente do CAP foram considerados três parâmetros: primeiro, o Tr do co-eluyente que foi o mesmo ou muito próximo ao Tr do CAP; segundo, a comparação do espectro de massas obtido com os dados da NIST; terceiro, dentre as possibilidades informadas pela NIST foi considerado que para o co-eluyente também ser detectado pelo DCE, este deve ser eletronegativo, sendo provavelmente compostos halogenados (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al*, 1995; CECCHI, 2003). Com isso, foram identificados como possíveis co-eluyentes os seguintes compostos: Ácido Palmítico Clorídrico ($C_{16}H_{31}ClO$) (Figura 16A); Ácido Láurico Clorídrico ($C_{12}H_{23}ClO$) (Figura 16B); Miristoil Clorídrico ($C_{14}H_{27}ClO$) (Figura 16C). Com os possíveis co-eluyentes identificados os ensaios prosseguiram com o CG/DCE para tentar eliminar o co-eluyente.

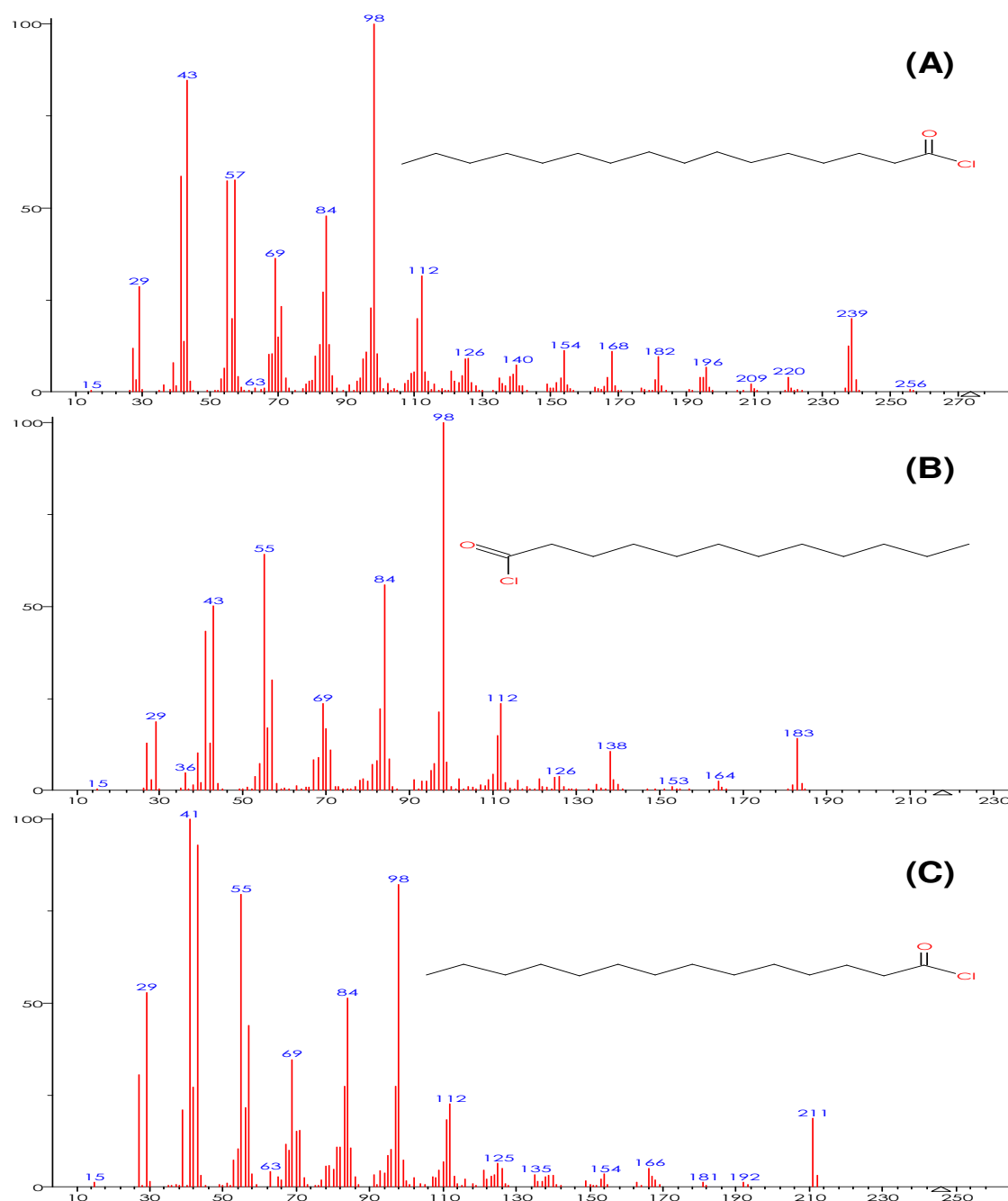


Figura 16. Espectros de massa dos possíveis co-eluentes do CAP para a matriz camarão: **(A)** Ácido Palmítico Clorídrico (C₁₆H₃₁ClO); **(B)** Ácido Láurico Clorídrico (C₁₂H₂₃ClO); **(C)** Miristoil Clorídrico (C₁₄H₂₇ClO).

3.2.2.2. Mel e Pólen

Os ensaios com as matrizes apícolas foram realizados de acordo com método descrito no fluxograma exposto na figura 17. As condições cromatográficas utilizadas no CG/DCE foram a mesmas adotadas nos ensaios com a matriz camarão no item 3.2.2.1., nas quais o Tr do CAP foi de 17 min.

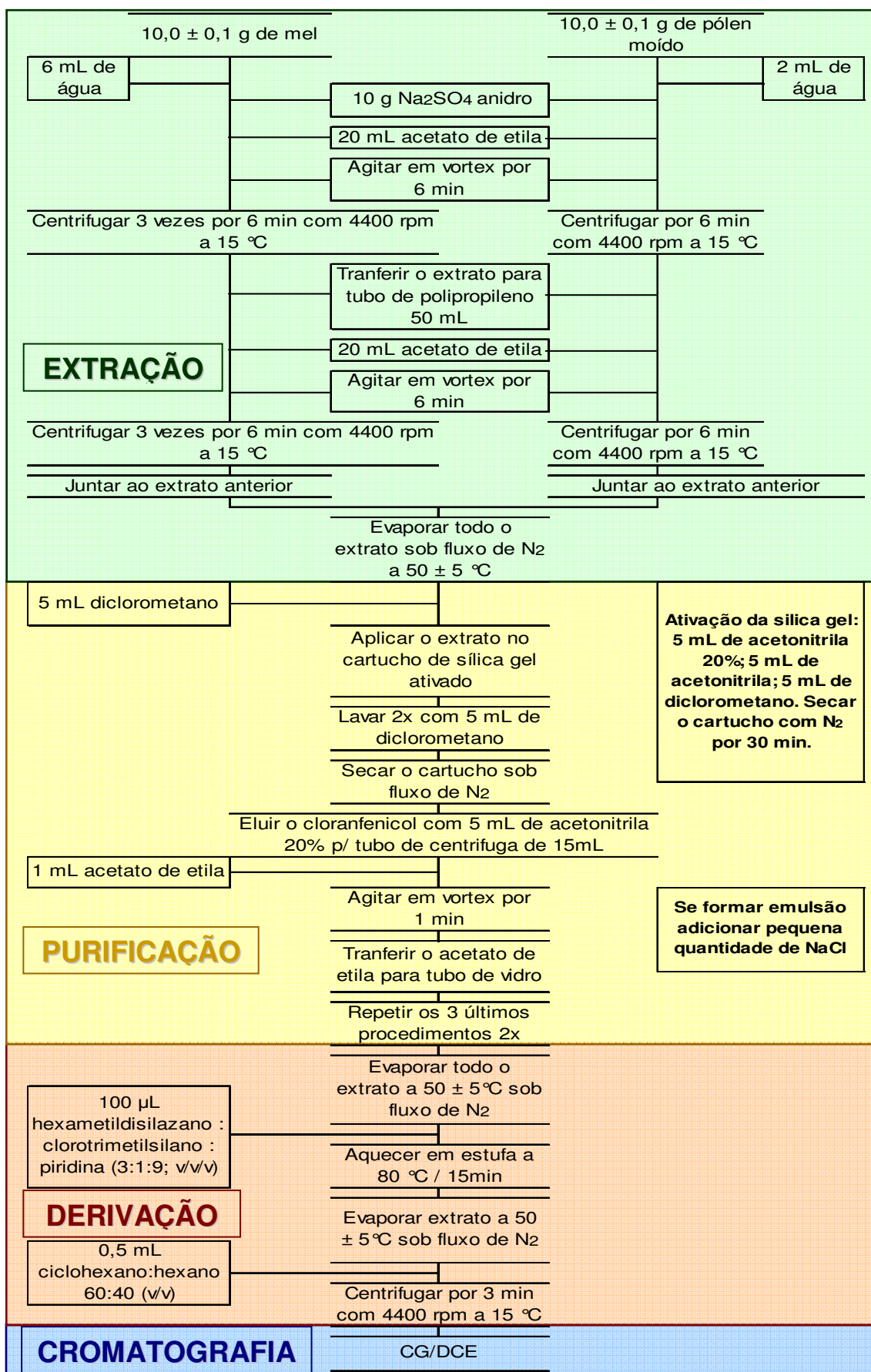


Figura 17. Fluxograma do primeiro método utilizado para determinação de resíduo de CAP nas matrizes mel e pólen.

As condições testadas resultaram nos cromatogramas da figura 18 nos quais, assim como no camarão, foi observada a presença de co-eluentes ao CAP. Nos cromatogramas das matrizes apícolas nestas condições a quantidade de impurezas foi grande desestabilizando muito a linha de base. Após as corridas o DCE continuava com um sinal muito elevado devido contaminação pelas impurezas destas matrizes.

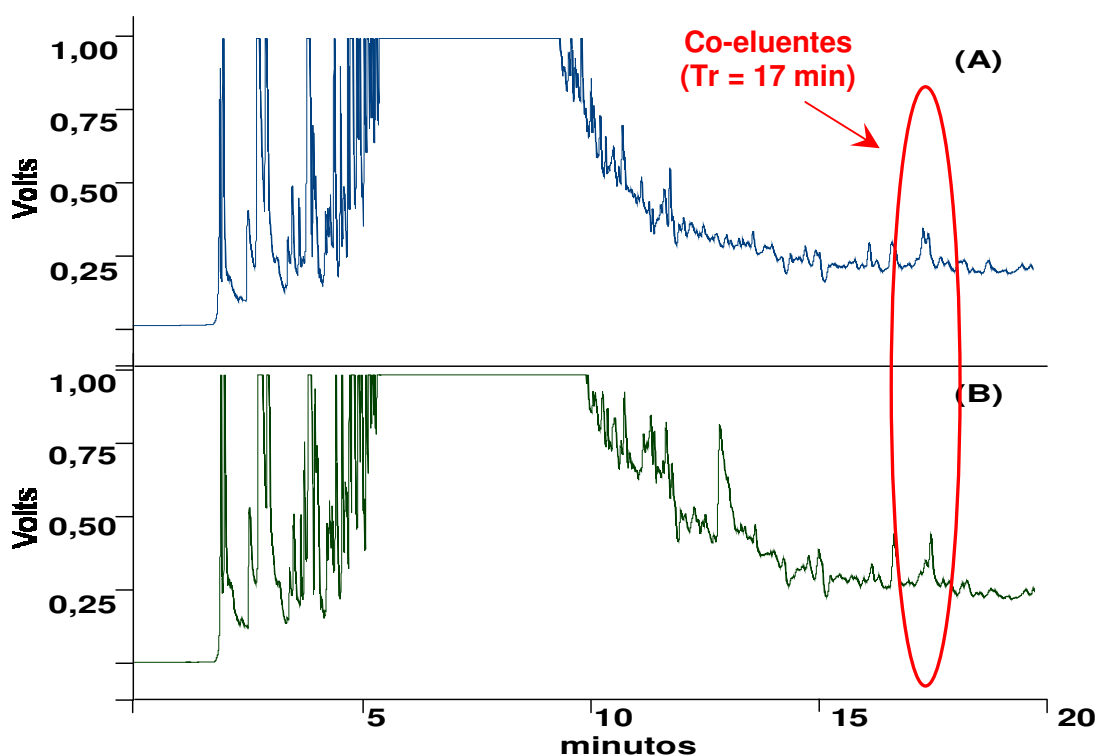


Figura 18. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método descrito na figura 17, ambos apresentam a presença de co-eluentes: **(A)** Matriz mel; **(B)** Matriz Pólen.

3.2.3. Alterações nas condições cromatográficas

Devido à detecção de co-eluentes, foram realizadas alterações na rampa de temperatura da coluna do CG/DCE para tentar retirar o co-eluente do mesmo Tr do CAP. Este estudo foi realizado com padrões de CAP silanizado (para determinar o Tr) e com as matrizes mel e camarão. As condições de extração para o camarão e o mel seguiram, respectivamente, os procedimentos descritos nas figuras 13 e 17.

As condições cromatográficas inicialmente adotadas foram as mesmas utilizadas nos ensaios para a determinação da seletividade das amostras de camarão, mel e pólen. Nestas condições a rampa de temperatura da coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) foram:

- Temperatura inicial: 80 °C / 1 min
- 1ª taxa de aquecimento: 30 °C / min
- Temperatura final: 230 °C / 14 min
- Tempo total de corrida: 20 min

As alterações realizadas nas condições de temperatura da coluna cromatográfica para as matrizes mel e camarão para tentar separar o co-eluyente estão descritas, respectivamente, nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Descrição das alterações na rampa de temperatura da coluna cromatográfica e seus respectivos resultados para a matriz mel.

Alteração da rampa	Objetivo da alteração	Tr do CAP (min)	Comportamento do cromatograma	Anexo
<ul style="list-style-type: none"> • Redução da 1ª taxa de aquecimento para 10 °C / min. • Temperatura final: 230 °C / 24 min. • Tempo total de corrida: 40 min. 	Propiciar maior interação entre a fase estacionária e o analito pra obter maior separação.	25,1	<ul style="list-style-type: none"> • A quantidade de impurezas foi muito grande. • Ultrapassou a faixa linear de resposta do DCE. • Houve maior separação, porém as impurezas se espalharam muito pelo cromatograma. • Existem co-eluentes no Tr do CAP. 	III
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da temperatura inicial para 90 °C / 1 min. • Aumento da 1ª taxa de aquecimento para 30 °C / min. • Aumento da temperatura final para 260 °C / 26,33 min. • Tempo total de corrida: 33 min. 	Concentrar as impurezas no início do cromatograma para criar espaço para o CAP eluir separadamente.	10,7	<ul style="list-style-type: none"> • A maior parte das impurezas se concentrou até 15 min de corrida, porém ainda co-eluem com o CAP. 	IV
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da temperatura inicial para 90 °C / 1 min. • Aumento da 1ª taxa de aquecimento para 60 °C / min até 200 °C / 7 min. • Inclusão de uma segunda taxa de aquecimento de 5 °C / min para elevar a temperatura a 260 °C / 18,16 min. • Tempo total de corrida: 40 min. 	Concentrar as impurezas no início do cromatograma para criar espaço para o CAP eluir separadamente.	19,8	<ul style="list-style-type: none"> • A quantidade de impurezas no mel é muito grande. A concentração de parte destas no início do cromatograma provoca uma elevação muito grande do sinal da linha de base. A faixa linear de resposta do DCE foi saturada (sinal maior que 1V) provocando desestabilização no detector, impossibilitando a detecção do CAP. 	V

Tabela 3. Descrição das alterações na rampa de temperatura da coluna cromatográfica e seus respectivos resultados para a matriz camarão.

Alteração da rampa	Objetivo da alteração	Tr do CAP (min)	Comportamento do cromatograma	Anexo
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da temperatura inicial para 90 °C / 1 min. • Aumento da 1ª taxa de aquecimento para 30 °C / min. • Aumento da temperatura final para 260 °C / 13,33 min. • Tempo total de corrida: 20 min. 	Concentrar as impurezas no início do cromatograma para criar uma janela de tempo para o CAP eluir separadamente.	10,7	<ul style="list-style-type: none"> • A maior parte das impurezas se concentrou até 10 min de corrida, porém ainda existem co-eluentes no mesmo Tr do CAP. 	VI
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da temperatura inicial para 90 °C permanecendo por 1 min. • Aumento da 1ª taxa de aquecimento para 60 °C / min até 150 °C / 7 min. • Inclusão de uma segunda taxa de aquecimento de 10 °C / min para elevar a temperatura a 260 °C / 20 min. • Tempo total de corrida: 40 min. 	Concentrar parte das impurezas no início do cromatograma e criar uma janela de tempo para o CAP eluir separadamente.	21,6	<ul style="list-style-type: none"> • Houve uma grande concentração de picos até 20 min de corrida, os picos não concentraram no início do cromatograma. • Entre 20 e 30 min são detectados menos picos, porém ainda existem co-eluentes. 	VII
<p>Mesmas condições anteriores, com as seguintes alterações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Segunda taxa de aquecimento de 5 °C / min para elevar a temperatura a 260 °C / 29 min. • Tempo total de corrida: 60 min. 	Criar janela de tempo acima dos 20 minutos de corrida para o CAP eluir separadamente.	29,5	<ul style="list-style-type: none"> • A separação das impurezas obteve uma maior resolução, porém o co-eluyente ainda está presente. 	VIII
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da temperatura inicial para 90 °C / 1 min. • Aumento da 1ª taxa de aquecimento para 60 °C / min até 200 °C / 7 min. • A segunda taxa de aquecimento de 5 °C / min para elevar a temperatura a 260 °C / 18 min. • Tempo total de corrida: 40 min. 	Concentrar parte das impurezas no início do cromatograma e criar uma janela de tempo para o CAP eluir separadamente.	19,8	<ul style="list-style-type: none"> • As impurezas ficaram mais concentradas até 15 min de corrida. • A quantidade de impurezas acima de 15 min foi menor que nos outros ensaios, porém o co-eluyente ainda está presente. 	IX

As alterações na rampa de temperatura da coluna cromatográfica não resultaram em cromatogramas sem o co-eluento no Tr do CAP. A quantidade de impurezas é muito grande, principalmente nas matrizes apícolas, foi constatado que para tentar separar o co-eluento seria necessário testar alterações o método de purificação por SPE (do inglês, *Solid Phase Extraction*, Extração em Fase Sólida) e aumentar a eficiência da coluna cromatográfica utilizada no CG/DCE.

3.2.4. Alterações na etapa de purificação

Nos ensaios realizados com as matrizes camarão, mel e pólen a fase estacionária que estava sendo utilizada como adsorvente na purificação por SPE era a sílica gel. A sílica é um polímero inorgânico e sua superfície é caracterizada pela presença de grupos silanóis (Si-OH) e Siloxanos (Si-O-Si) (AIROLDI & FARIAS, 2000; REYNAUD, 2005; ZIEF & KISER, 2009). Os silanóis constituem o principal sítio de adsorção, porém apresenta alta reatividade (REYNAUD, 2005). A desigual distribuição de densidade eletrônica nos grupos silanóis, faz com que eles manifestem um comportamento de ácidos de Bronsted. Desta forma, os sítios ácidos são responsáveis pela reatividade que ocorre na superfície da sílica (AIROLDI & FARIAS, 2000). Os silanóis podem estar na forma livre, ligados a um ou mais grupos hidroxilas ou ainda formando pontes de hidrogênio entre dois grupos Si-OH distintos (REYNAUD, 2005). Estes sítios ácidos se distribuem aleatoriamente na superfície da sílica e dependendo da maneira como estes se encontram dispostos, são denominados como vicinais, isolados ou geminais (Figura 19). Estudos demonstram que o grupo silanol geminal é o mais reativo das espécies de superfície (PIZZUTTI *et al*, 1997).

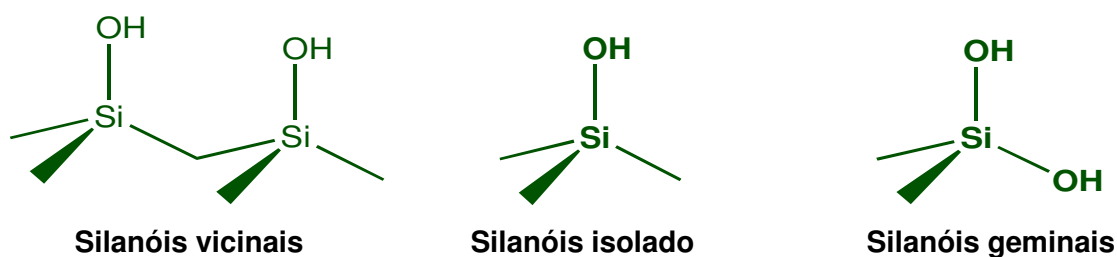


Figura 19. Esquema dos tipos de grupos silanóis normalmente encontrados na superfície da sílica gel.

Para avaliar a reatividade da sílica, inicialmente, foram realizados dois ensaios com camarão utilizando para a purificação uma SPE com fase estacionária sílica gel (Figura 13) e a outra com C18 (Octadecilsilano) (Figura 20) a fim de verificar se havia possível reação dos componentes da matriz com a sílica gel formando maior quantidade de impurezas. A fase estacionária C18 é formada pela inativação dos sítios ácidos da sílica gel pela ligação de uma cadeia de 18 carbonos (ZIEF & KISER, 2009). As condições cromatográficas utilizadas no CG/DCE foram: injeção de 1 μ L no modo *splitless* com *liner* de 2 mm e o tempo de 0,5 min para a abertura da válvula *split*. A separação foi realizada com coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) sob as seguintes condições de temperatura: 90 °C durante 1 min aumentando sob taxa de 60 °C/min até 200 °C permanecendo por 7 min, então aquecendo a 5 °C/min até 260 °C permanecendo nesta temperatura por 18 min, totalizando 40 min de corrida. O gás de arraste utilizado foi Hélio sob um fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 280 e 320 °C. Os resultados destes ensaios podem ser observados na figura 21.

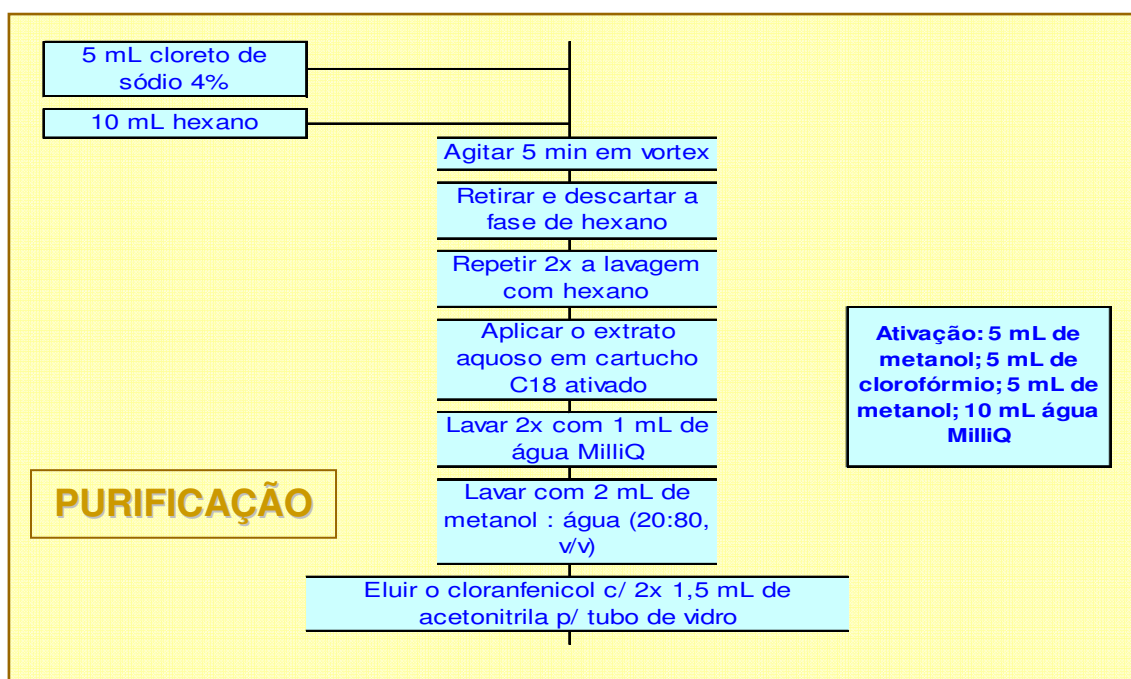


Figura 20. Fluxograma da etapa de purificação do método alterada (inclusão de lavagem com hexano e da purificação SPE C18).

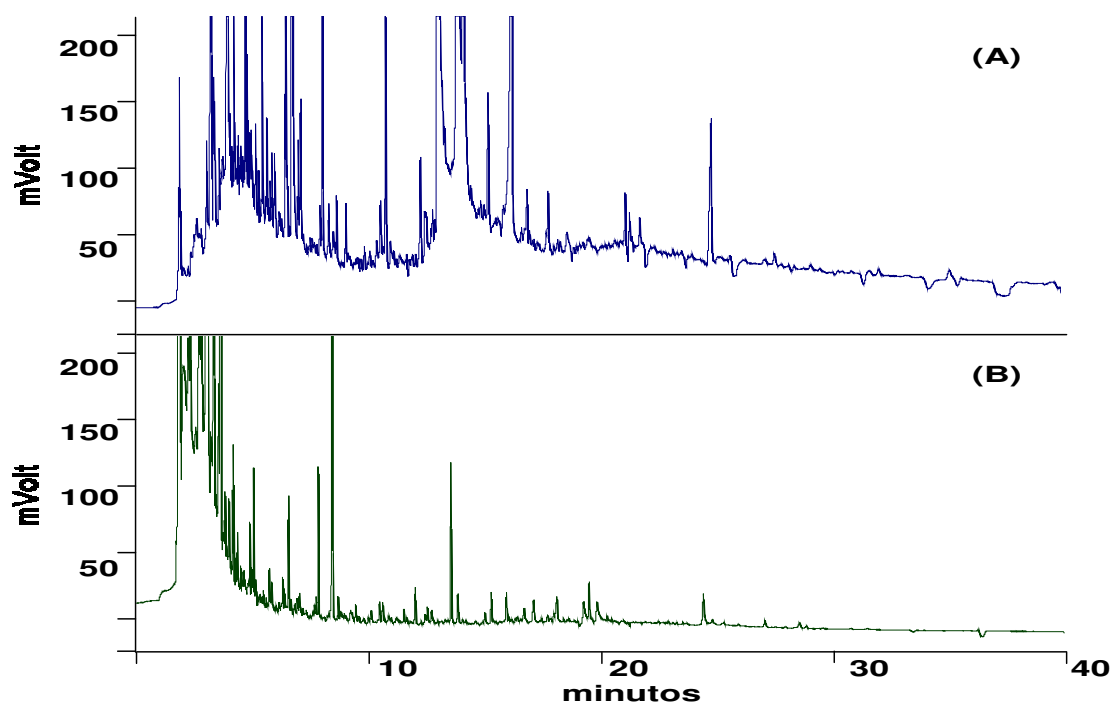


Figura 21. Cromatogramas CG/DCE do extrato da matriz camarão purificados por dois diferentes tipos de cartuchos SPE: **(A)** Purificação por SPE com Sílica Gel; **(B)** Purificação por SPE com C18.

Pela análise dos resultados obtidos observa-se que existem diferenças na composição dos extratos obtidos pelas duas colunas SPE na purificação. O cromatograma resultante da purificação com sílica gel apresenta mais impurezas do que o cromatograma obtido pela purificação com C18. Esta diferença pode ter ocorrido por três motivos:

- a. A sílica gel pode ter catalisado reações na coluna SPE o que provocou a formação de novos componentes, culminando em um cromatograma com mais impurezas.
- b. A diferença entre a composição dos cromatogramas pode ser devido a diferença entre os mecanismos de separação e de polaridade entre as colunas SPE de sílica gel e C18. A coluna SPE de sílica gel tem uma característica mais polar e atua pelo mecanismo da adsorção, por outro lado a coluna SPE de C18 é apolar e atua pelo mecanismo da partição (ZIEF & KISER, 2009). Portanto, cada coluna retém compostos químicos de características distintas.
- c. A inclusão da etapa de lavagem com hexano prévia a purificação na coluna C18 pode ter reduzido o número de impurezas.

Os compostos identificados pela interpretação dos espectros de massas obtidos pelo CG/EM mostram que os co-eluentes do CAP na extração do camarão, são ácidos graxos clorados (Figura 16). A maioria dos métodos existentes para a determinação de resíduos de CAP em diversas matrizes exige a extração da parte lipídica das amostras com solventes orgânicos apolares e também com a etapa de purificação com SPE (SIQUEIRA, 2007). O processo de extração com solventes geralmente é realizado utilizando-se hexano, clorofórmio e/ou heptano (HORMAZABAL & YNDESTAD, 2001; RONNING *et al*; 2006; SIQUEIRA, 2007; RODZIEWICZ & ZAWADZKA, 2008). Esta etapa é crucial, pois a presença de gorduras pode diminuir a eficiência do processo de purificação na SPE. Diversas composições de fases sólidas são utilizadas para a purificação de extratos nos métodos para determinação de CAP em alimentos (SIQUEIRA, 2007). A fase sólida que estava sendo usada para a extração do camarão foi sílica e não foi utilizada nenhuma etapa de lavagem com solventes orgânicos apolares. Devido a isto, o método de extração foi alterado (Figura 20) inserindo a etapa de partição com hexano e a SPE com C18. Nesta nova condição adotada foram obtidos os cromatogramas da figura 22.

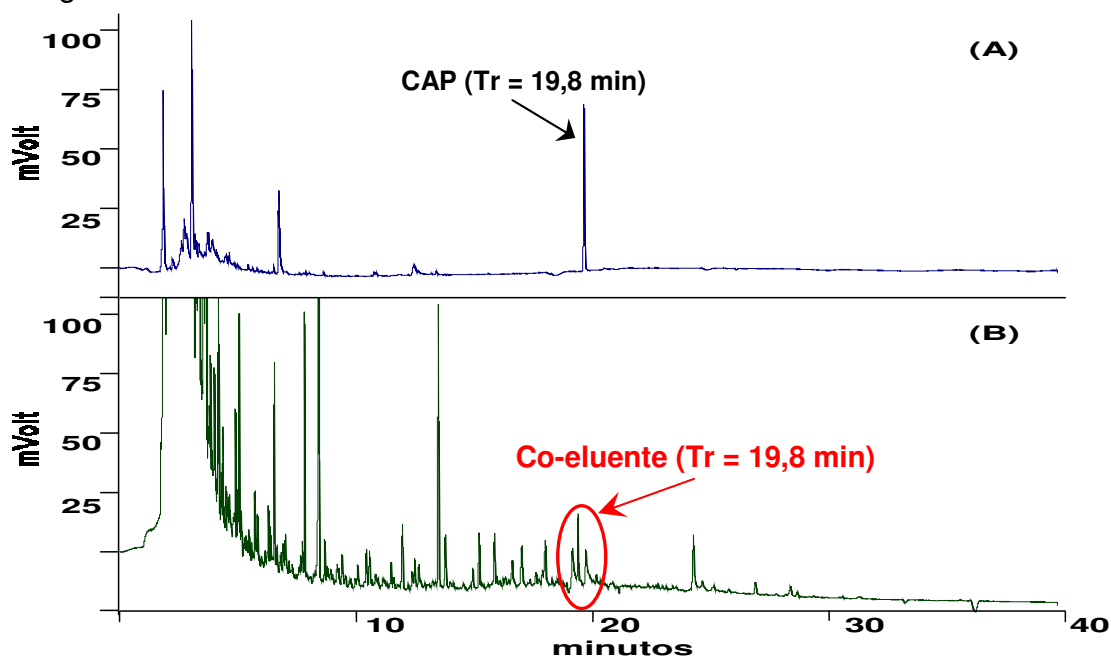


Figura 22. Cromatogramas CG/DCE: (A) Solução padrão de CAP silanizado de 15 µg/L; (B) Cromatograma da matriz camarão obtido pelo método de extração com inclusão de lavagem com hexano e da purificação SPE C18 (Figura 20).

Com este resultado observa-se que a quantidade de impurezas reduziu, porém o co-elute ainda está presente no Tr do CAP (19,8 min), mostrando que as alterações realizadas na etapa de purificação reduziram as impurezas, porém não conseguiram retirar o co-elute para a matriz camarão.

Considerando-se as modificações do método na etapa de purificação foi realizado um novo ensaio com as matrizes mel e pólen, seguindo as condições descritas na figura 20. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas adotadas no ensaio com camarão. Nesta nova condição adotada foi obtido o cromatograma da figura 23.

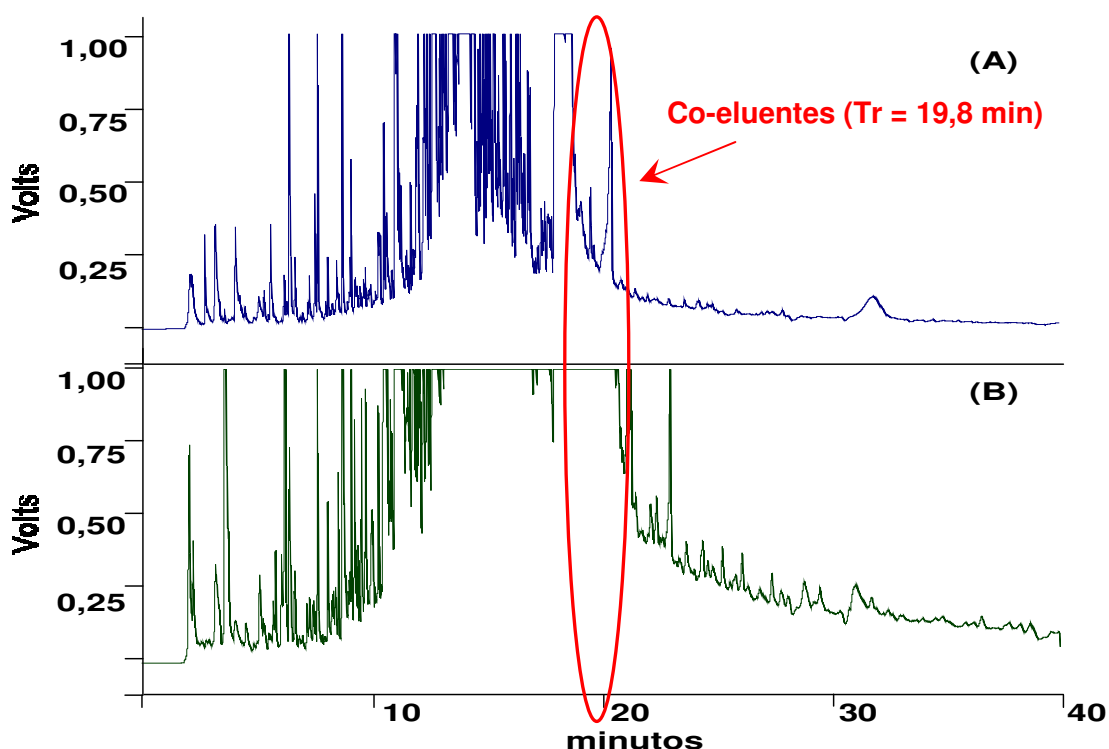


Figura 23. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método de extração com inclusão de lavagem com hexano e da purificação SPE C18 para as matrizes apícolas (Figura 20): **(A)** Matriz mel; **(B)** Matriz Pólen.

Com este resultado observa-se que a quantidade de impurezas nas matrizes apícolas também reduziu, assim como aconteceu com o camarão (Figura 22), porém esta redução foi em menor intensidade. As impurezas ainda ultrapassam a faixa linear de respostas do DCE, assim como aconteceu com o método com purificação por SPE com sílica gel. A linha de base ficou muito elevada devido à desestabilização do DCE pela concentração elevada de

impurezas. Isto impossibilitou a obtenção da seletividade nas condições testadas.

Como a purificação com SPE C18 resultou em cromatogramas com menos impurezas, este procedimento foi adotado para os ensaios seguintes.

3.2.5. Duas colunas DB1 e junção das duas SPEs

3.2.5.1. Alteração no comprimento da coluna capilar DB1

A eficiência de uma coluna cromatográfica é a capacidade que esta possui em eluir o analito (pico) com o mínimo de dispersão. A eficiência de uma coluna cromatográfica é medida pelo número de pratos teóricos (N) gerados nas condições utilizadas. Um prato teórico é definido como sendo um equilíbrio de distribuição do soluto entre as duas fases do sistema cromatográfico (Fase móvel e fase estacionária). Quanto mais pratos teóricos, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação com menor dispersão do analito. Diversos fatores podem afetar o número de pratos teóricos gerados dentre os quais: tempo de retenção, comprimento da coluna, temperatura da coluna, velocidade da fase móvel, dentre outros (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al*, 1995; AQUINO & NUNES, 2003).

A dispersão de um pico refere-se ao alargamento de sua base. Um analito disperso em um sistema cromatográfico forma um pico que perde tamanho em altura e ganha em largura de sua base. A largura da base de um pico é inversamente proporcional a resolução do cromatograma. Por sua vez, a resolução mede o grau de separação entre dois picos consecutivos (LANÇAS, 1993; AQUINO & NUNES, 2003). Portanto, o grau de separação entre picos (resolução) em uma análise cromatográfica está diretamente relacionado com a eficiência da coluna.

Devido à presença de co-eluentes nos ensaios realizados com as matrizes foram conectadas duas colunas DB1 de 30 m cada, totalizando 60 m de coluna. O aumento do comprimento da coluna cromatográfica foi realizado buscando aumentar a eficiência e, conseqüentemente obter uma melhor separação dos compostos presentes no cromatograma na tentativa de obter a separação entre o CAP e o co-eluente.

O ensaio para avaliar a separação com os 60 m de coluna foi realizado utilizando a matriz camarão devido esta ter apresentado menor quantidade de impurezas em relação às matrizes apícolas. O método de extração (Figura 20) e as condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas adotadas no ensaio descrito no item 3.2.4., a única alteração foi o tempo e permanência da coluna na temperatura final que foi alterada de 18 para 58 min, totalizando 80 min de corrida. Os resultados obtidos neste ensaio estão expostos na figura 24.

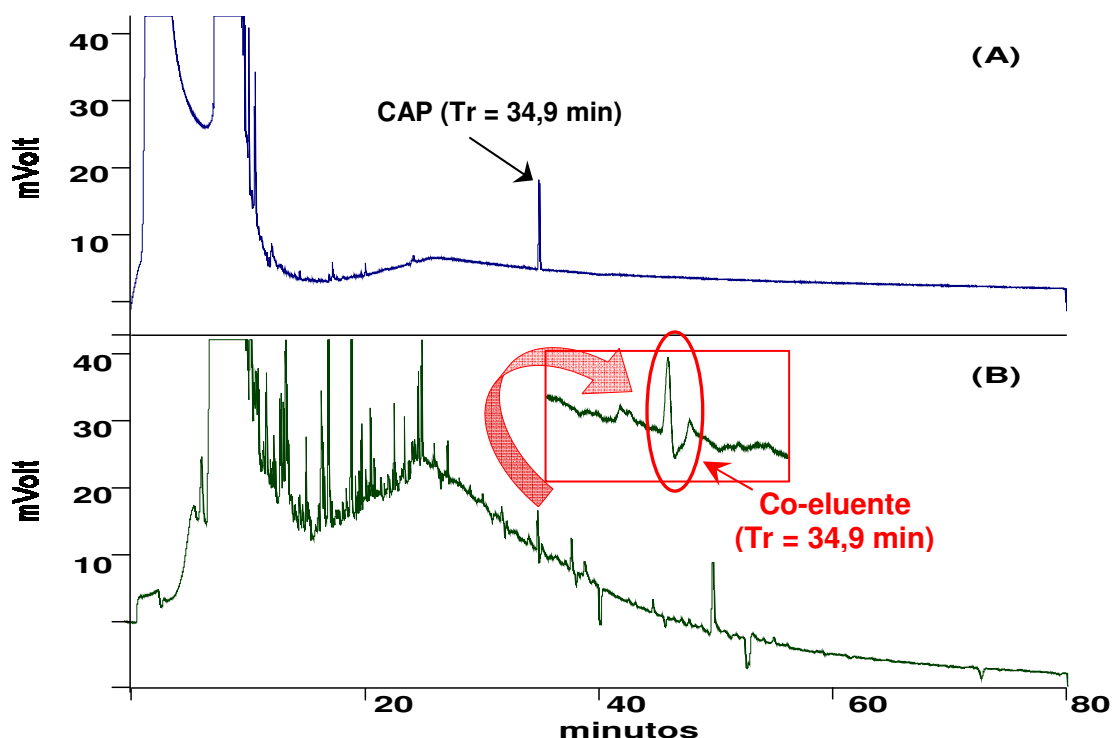


Figura 24. Cromatogramas CG/DCE utilizando 60 m de coluna DB1: **(A)** Solução padrão de CAP silanizado; **(B)** Matriz camarão.

Avaliando-se os dados obtidos constatou-se que há uma redução da quantidade de picos próximos ao Tr do CAP, porém o co-eluyente ainda permanece presente no cromatograma. Devido a isto, foram modificadas as condições da rampa de temperatura da coluna para propiciar uma maior interação entre os componentes da amostra e a coluna cromatográfica. A nova rampa de temperatura da coluna adotada foi 90 °C durante 1 min aumentando sob taxa de 60 °C/min até 200 °C permanecendo por 7 min, aquecendo a 5 °C/min até 230 °C permanecendo por 3 min e então aquecendo a 5 °C/min até 260 °C permanecendo nesta temperatura por 65,17 min, totalizando 90 min de

corrida. Nesta nova condição foram injetados novamente uma solução padrão e o extrato do camarão para avaliar a existência de co-eluentes (Figura 25).

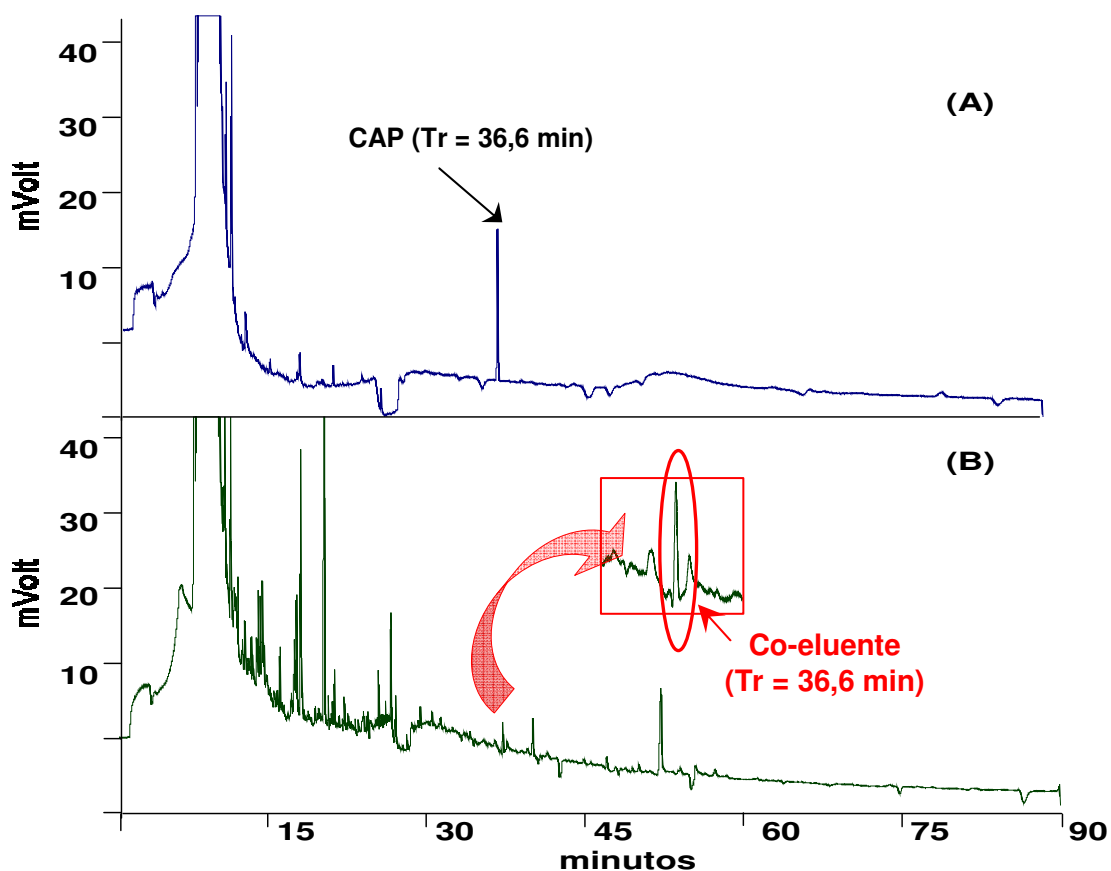


Figura 25. Cromatogramas CG/DCE utilizando 60 m de coluna DB1 e modificações na rampa de temperatura: **(A)** Solução padrão de CAP silanizado; **(B)** Matriz camarão.

Os resultados obtidos pelo ensaio realizado na nova rampa de temperatura não foram eficazes para separar o co-eluente do CAP. Devido a isto, os ensaios prosseguiram com alterações na purificação por SPE para tentar reduzir o número de impurezas, inclusive o co-eluente. As condições cromatográficas com a nova rampa de temperatura definidas neste ensaio foram utilizadas nos ensaios seguintes.

3.2.5.2. Purificação com junção das duas colunas SPE (Sílica gel e C18)

As diferenças obtidas no ensaio comparando a purificação com SPE de sílica gel e de C18 descrito no item 3.2.4. (Figura 21) podem ter ocorrido devido à diferença entre os mecanismos de separação e de polaridade entre as diferentes colunas SPE, e não somente pela reatividade da sílica gel.

Dentre os modos de separação que a SPE pode atuar dois destes são os mais aplicados:

1. SPE de Fase Normal: consiste num sistema onde a fase sólida é mais polar que a fase líquida (Ex.: SPE com Sílica gel) (AQUINO & NUNES, 2003).
2. SPE de Fase Reversa: consiste no sistema onde a fase sólida é menos polar que a fase líquida (Ex.: SPE com C18) (AQUINO & NUNES, 2003).

A técnica de SPE por fase reversa é utilizada quando as impurezas são mais polares que o analíto, pois as impurezas mais polares são eliminadas. A SPE de fase normal funciona de modo inverso, as impurezas mais apolares são eliminadas (AQUINO & NUNES, 2003; ZIEF & KISER, 2009). Isto pode justificar as diferenças obtidas no ensaio comparativo da purificação com SPE de sílica gel e de C18. Devido a isto foram realizados ensaios associando as duas técnicas de SPE por fase normal e por fase reversa em uma mesma purificação para verificar se obtinha cromatogramas com menos impurezas.

O primeiro ensaio foi realizado com a matriz camarão seguindo as condições de purificação descritas na figura 26. Este ensaio utilizou primeiro a purificação por SPE com C18 e sequencialmente com a sílica gel. As condições cromatográficas utilizadas foram as definidas no item 3.2.5.1.. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 27A.

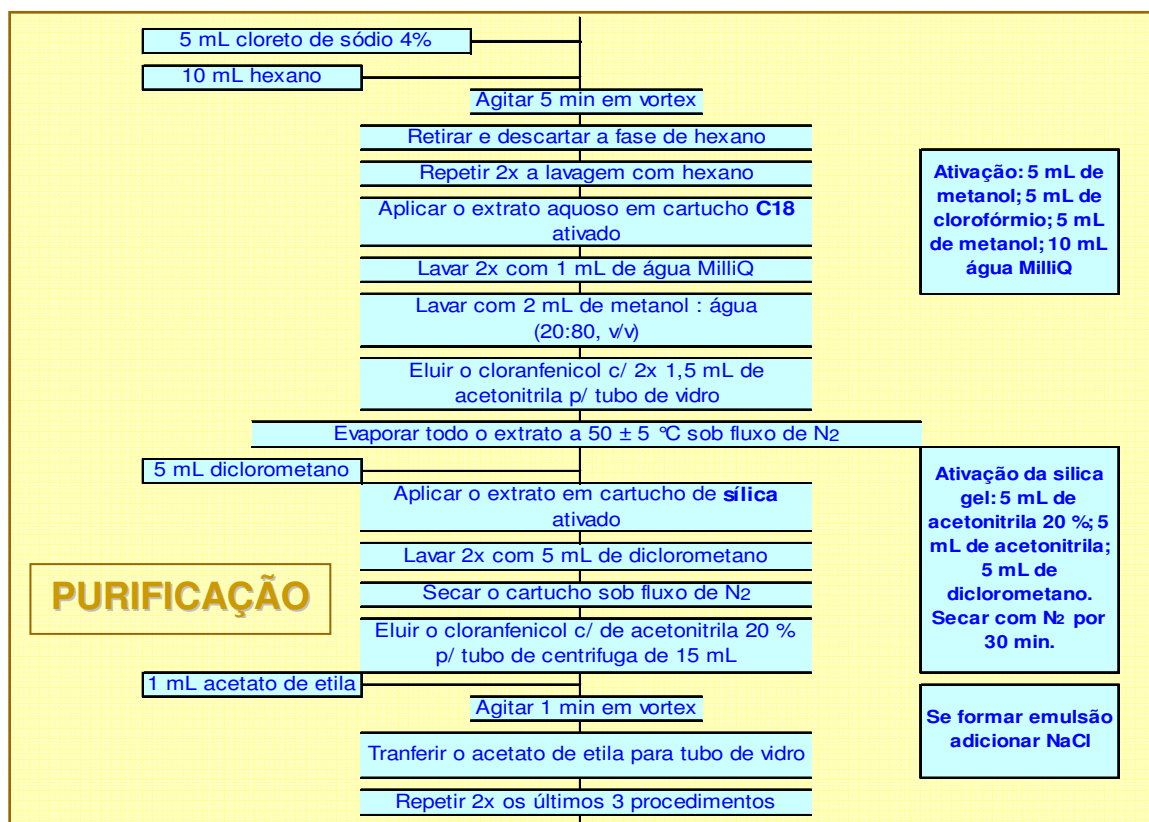


Figura 26. Fluxograma da etapa de purificação do método alterada (purificação por duas colunas SPE, respectivamente, **C18** e **sílica gel**).

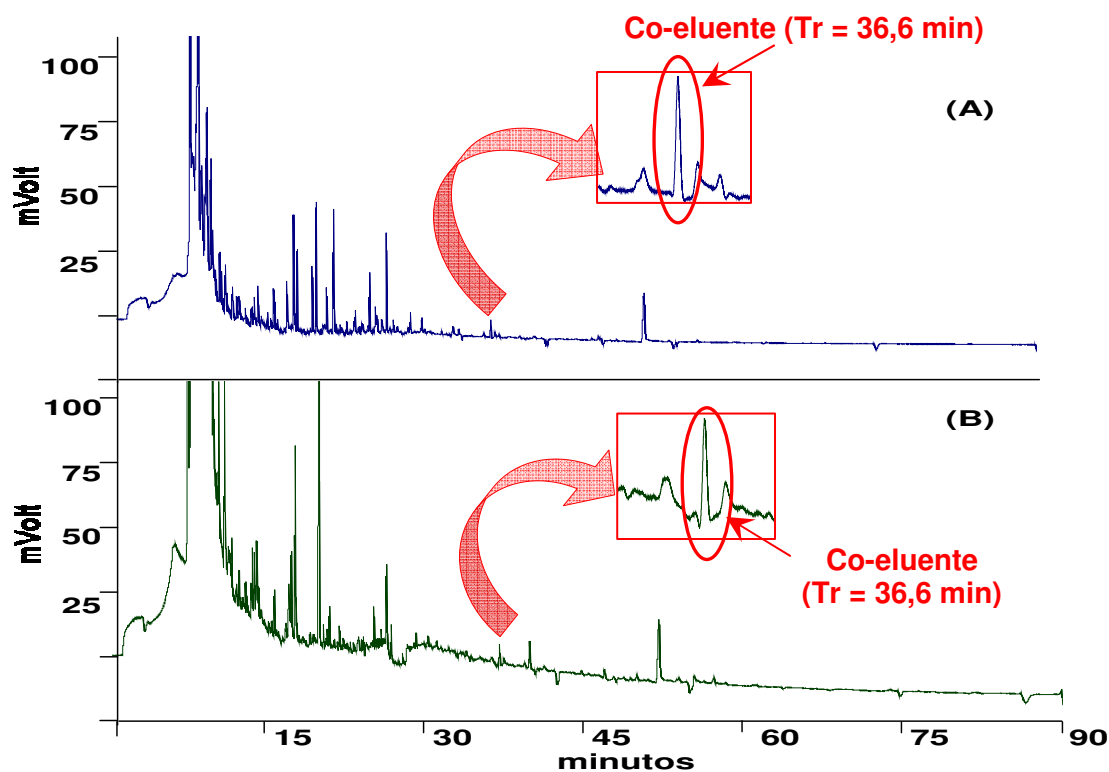


Figura 27. Cromatogramas CG/DCE comparando métodos com etapas de purificação em duas condições diferentes para a matriz camarão: **(A)** Purificação por duas colunas SPE, respectivamente, **C18** e **sílica gel**; **(B)** Purificação apenas por SPE **C18**.

A figura 27 mostra o cromatograma obtido com a purificação pelas duas colunas de SPE comparado com o cromatograma de um extrato de camarão purificação apenas pela SPE C18. Nesta comparação pode-se observar que a associação das duas colunas de SPE reduziu a quantidade de impurezas no cromatograma. Entretanto, considerando que nestas condições cromatográficas o Tr do CAP é de 36,62 min, nota-se que o co-elute ainda está presente.

Foi avaliado também outro ensaio com a matriz camarão utilizando primeiro a purificação por SPE com sílica gel e em segundo com C18 (Figura 28). As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas do ensaio anterior. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 29.

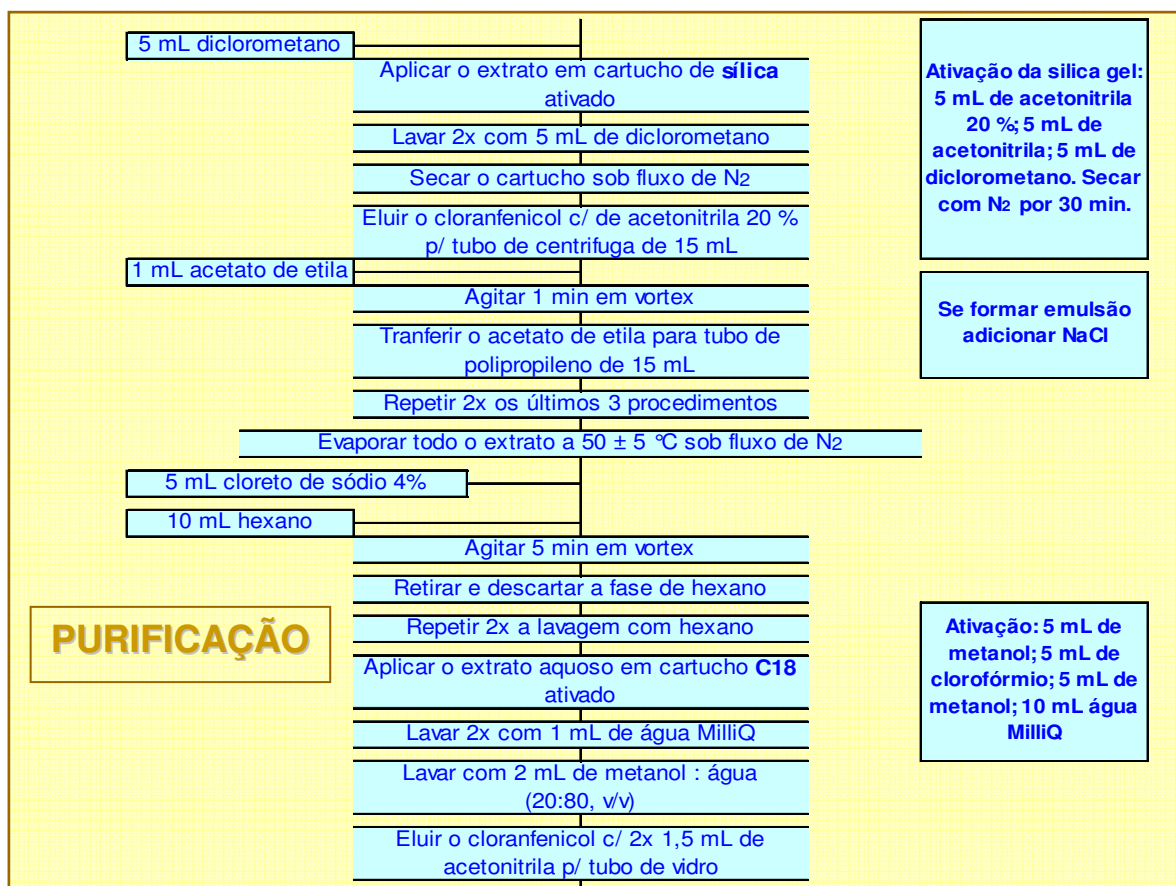


Figura 28. Fluxograma da etapa de purificação do método alterada (purificação por duas colunas SPE, respectivamente, **silica gel** e **C18**).

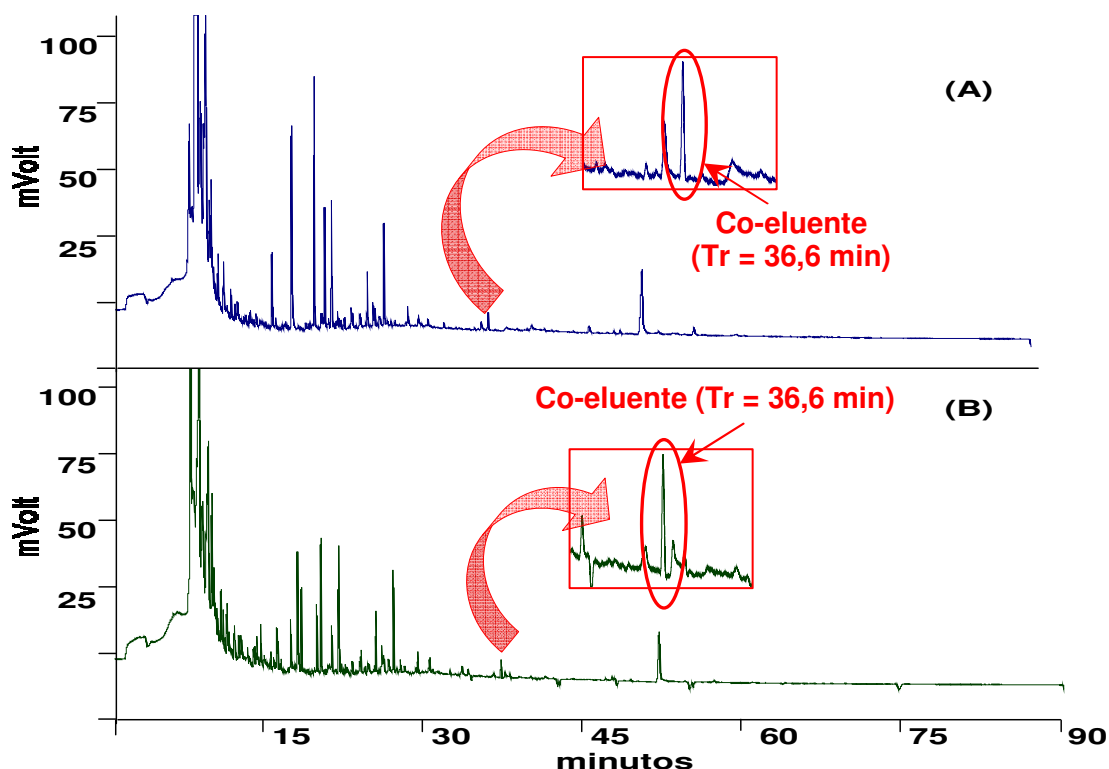


Figura 29. Cromatogramas CG/DCE comparando métodos com etapas de purificação em duas condições diferentes para a matriz camarão: **(A)** Purificação por duas colunas SPE, respectivamente, **sílica gel** e **C18**; **(B)** Purificação por duas colunas SPE, respectivamente, **C18** e **sílica gel**.

Comparando o cromatograma obtido com o cromatograma do método que associou as técnicas de SPE utilizando primeiro C18 e em segundo a sílica gel, pode-se observar que o perfil dos cromatogramas foi muito semelhante, variando apenas a concentração de algumas impurezas. Também pode ser observado que o co-eluyente ($Tr = 36,62$ min) ainda está presente. Isso demonstra que a ordem em que as técnicas de SPE foram aplicadas não influenciou o resultado. Devido a isto, para as matrizes mel e pólen somente foi somente avaliado o ensaio com purificação por SPE com sílica gel seguida da SPE com C18. Os resultados deste ensaio com as matrizes apícolas podem ser observados na figura 30.

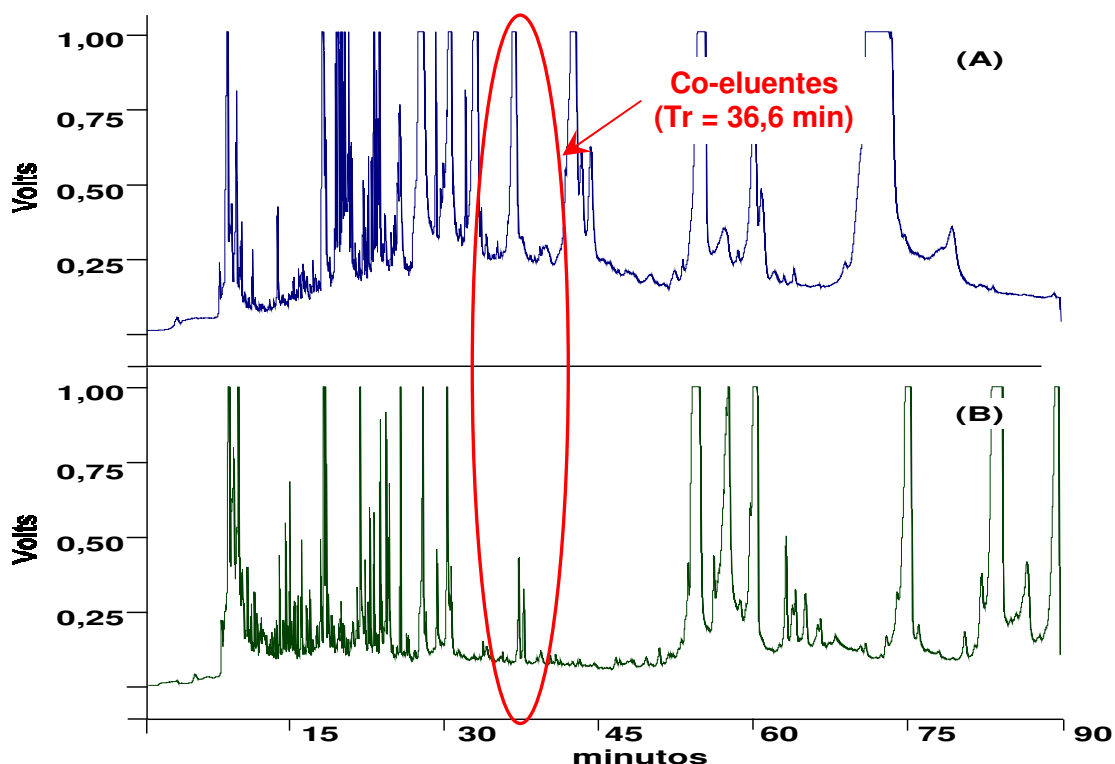


Figura 30. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método com purificação feita por duas colunas SPE, respectivamente, sílica gel e C18. **(A)** Matriz mel; **(B)** Matriz pólen.

Os resultados dos ensaios com purificação com duas colunas SPE para mel e pólen, assim como todos os outros ensaios realizados com essas matrizes demonstraram uma quantidade muito grande de impurezas. As alterações adotadas na tentativa de purificar os extratos foram ineficazes, com isso sempre ocorreram co-eluentes ao CAP.

As abelhas operárias fazem em média de 10 viagens por dia para explorar aproximadamente 7 km² nas áreas que cercam seu habitat, recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores. Durante este processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados pelas abelhas e ficam retidos nos pêlos superficiais do seu corpo ou são inalados e unidos em seu aparelho respiratório. Devido a estes fatores, as abelhas podem ser usadas como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental causado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como: parasitas, resíduos industriais ou pesticidas (WINSTON, 1987; EUROPEAN COMMUNITY, 1990; BOGDANOV, 2005; RISSATO *et al*, 2006). A grande quantidade de impurezas observadas em todos os cromatogramas das

matrizes apícolas pode ser devido a esta característica das abelhas. Por exemplo, os resíduos de pesticidas halogenados bio-acumulados pelas abelhas no mel e no pólen, podem ser detectados facilmente pelo DCE (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al*, 1995; AQUINO & NUNES, 2003), culminando em um grande número de impurezas nos cromatogramas. Devido a isto foram interrompidos os ensaios com as matrizes apícolas.

3.2.6. Outras matrizes

Como nos ensaios com as matrizes camarão, mel e pólen não foram possíveis obter as seletividades do método devido à presença de co-eluentes, foram testadas extrações com outras matrizes a fim de avaliar a seletividade. As novas matrizes avaliadas foram: carnes de avestruz (coxa), tilápias (filé), carneiro (pernil), bode (pernil) e leite caprino. Estas matrizes foram escolhidas devido não terem sido encontrados métodos para a determinação de resíduos de CAP para as mesmas.

3.2.6.1. Aquisição e processamento

As amostras de coxa de avestruz, filé de tilápia, pernil caprino, pernil ovino e leite caprino UHT foram adquiridas em supermercados do município de Salvador/BA. Todas as amostras inicialmente foram identificadas e registradas.

As tilápias foram filetadas e, assim como as amostras de avestruz, carneiro e bode, foram moídas com o auxílio de um multiprocessador de alimentos e acondicionadas em recipiente de vidro, devidamente rotulado, hermeticamente fechado e, por fim, armazenadas a – 18 °C até o momento das análises. As amostras de leite caprino não necessitaram de nenhum processamento, sendo armazenadas na embalagem original sob temperatura de resfriamento até o momento da análise.

3.2.6.2. Método de extração e condições cromatográficas

A metodologia de análise e as condições cromatográficas para as novas matrizes foram selecionadas a partir dos resultados obtidos nos ensaios

anteriores realizados com padrões e com as matrizes camarão, mel e pólen. Foram adotadas para as novas matrizes as condições descritas na figura 20 que utiliza lavagens com hexano e a purificação por SPE com C18. As condições cromatográficas adotadas no CG/DCE foram: injeção de 1 μ L no modo *splitless* com *liner* de 2 mm e o tempo de 0,5 min para a abertura da válvula *split*. A separação foi realizada com duas colunas capilares DB-1 conectadas sob as seguintes condições de temperatura: 90 °C durante 1 min aumentando sob taxa de 60 °C/min até 200 °C permanecendo por 7 min, aquecendo a 5 °C/min até 230 °C permanecendo por 3 min e então aquecendo a 5 °C/min até 260 °C permanecendo nesta temperatura por 35,17 min, totalizando 60 min de corrida. O gás de arraste utilizado foi Hélio a 1 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 280 e 320 °C. Nestas condições o Tr do CAP já foi definido como sendo 36,6 min (Figura 25A).

3.2.6.3. Avestruz e Tilápia

Os resultados obtidos com os ensaios com as matrizes de carnes de avestruz e de tilápia estão demonstrados na figura 31.

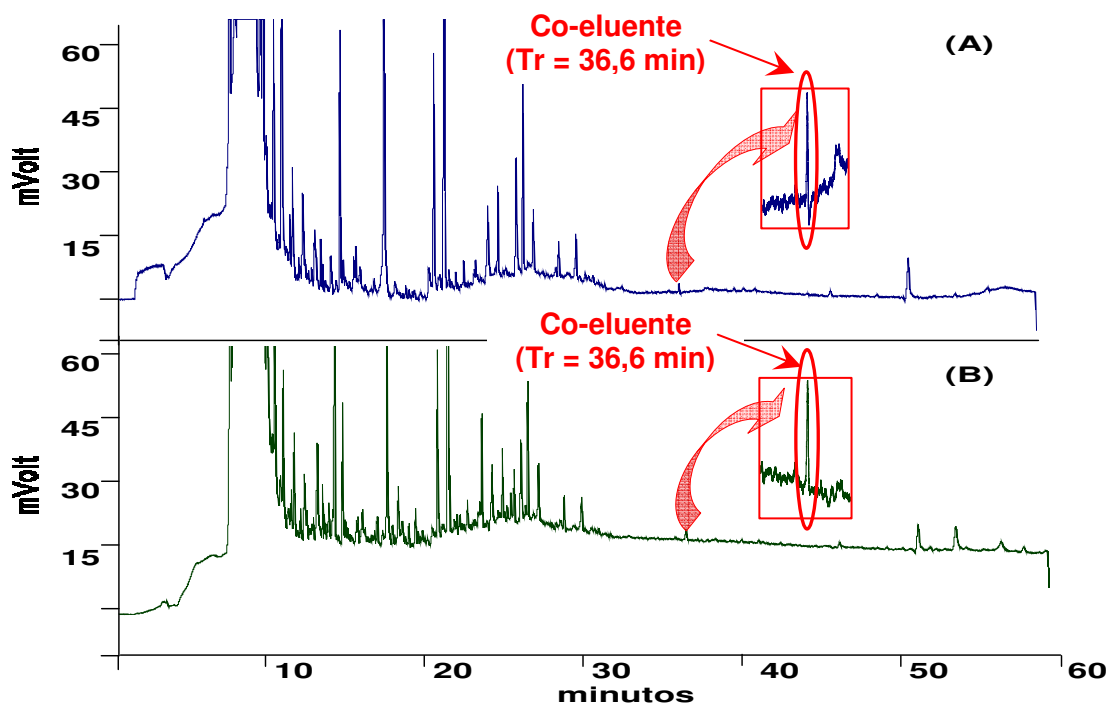


Figura 31. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método com purificação feita por lavagens com hexano e SPE com C18, nas matrizes: **(A)** Matriz avestruz; **(B)** Matriz tilápia.

Pela análise dos cromatogramas obtidos (Figura 31) observa-se que no Tr do CAP para esta condição cromatográfica existem co-eluentes. Porém, comparando o cromatograma das matrizes avestruz e tilápia com o obtido para a matriz camarão (Figura 25B) pode ser observado que a quantidade de impurezas no cromatograma das carnes de avestruz e de tilápia é muito menor.

3.2.6.4. Carnes caprinas e ovinas e leite caprino

Os resultados obtidos pelas extrações com as matrizes de carnes caprinas e ovinas, e leite caprino estão expostos na figura 32.

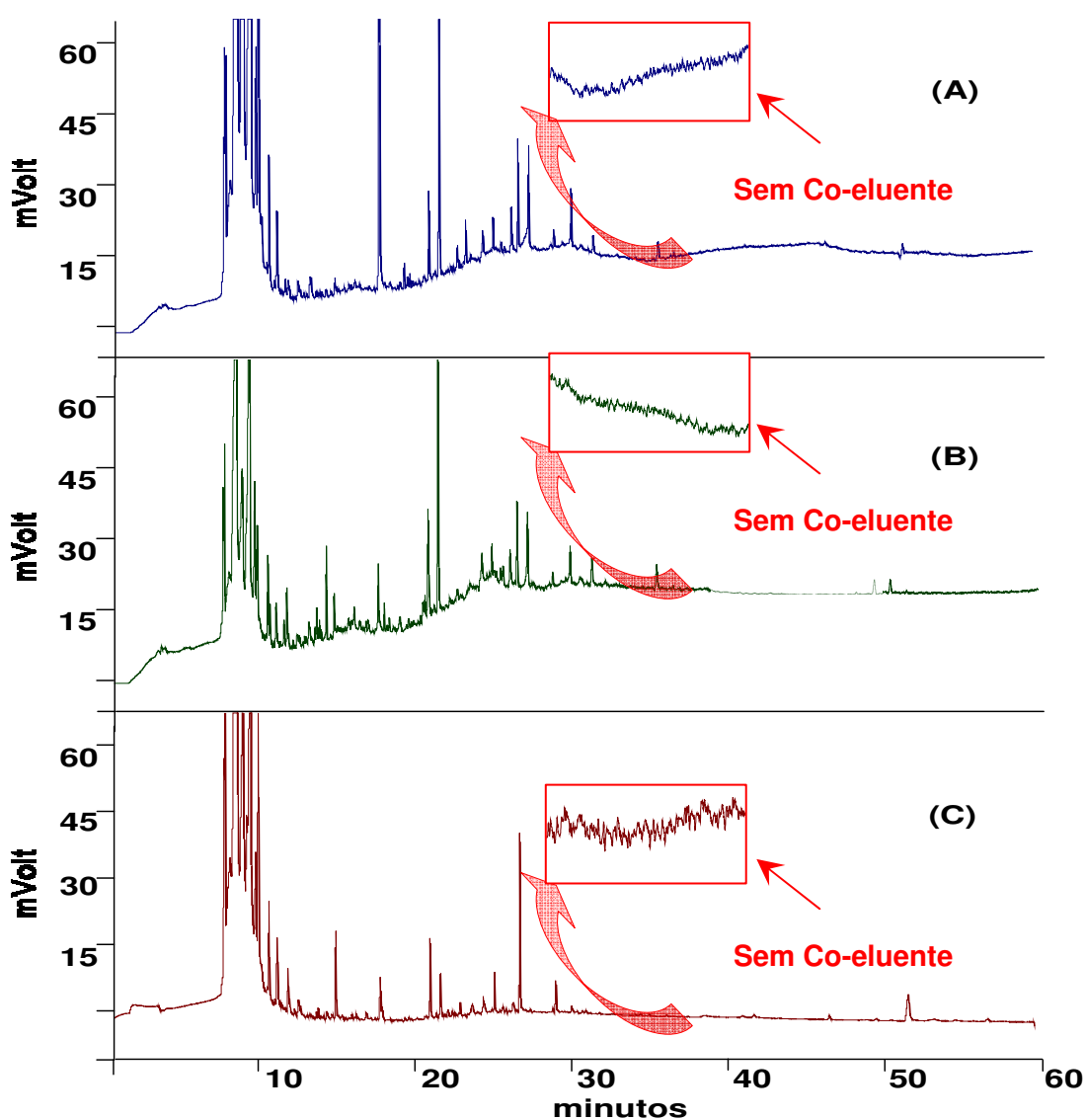


Figura 32. Cromatogramas CG/DCE obtidos pelo método com purificação feita por lavagens com hexano e SPE com C18, nas matrizes: **(A)** Carne ovina; **(B)** Carne caprina; **(C)** Leite caprino.

Avaliando-se os dados obtidos para estas matrizes constata-se que os cromatogramas também apresentam menos impurezas quando comparados com o cromatograma do camarão (Figura 25B). No Tr do CAP não há co-eluentes, com isso foi possível obter a seletividade do método utilizando purificação por lavagens com hexano e SPE com C18 e utilizando 60 m de coluna DB1.

3.3. Método otimizado

Com os resultados obtidos nos ensaios realizados com padrões e com as diferentes matrizes foi possível obter condições otimizadas de extração, purificação, derivação e das condições de separação cromatográfica para determinar resíduos de CAP nas matrizes: carnes caprina, ovinas e no leite caprino. Todas as condições otimizadas estão expostas na figura 33.

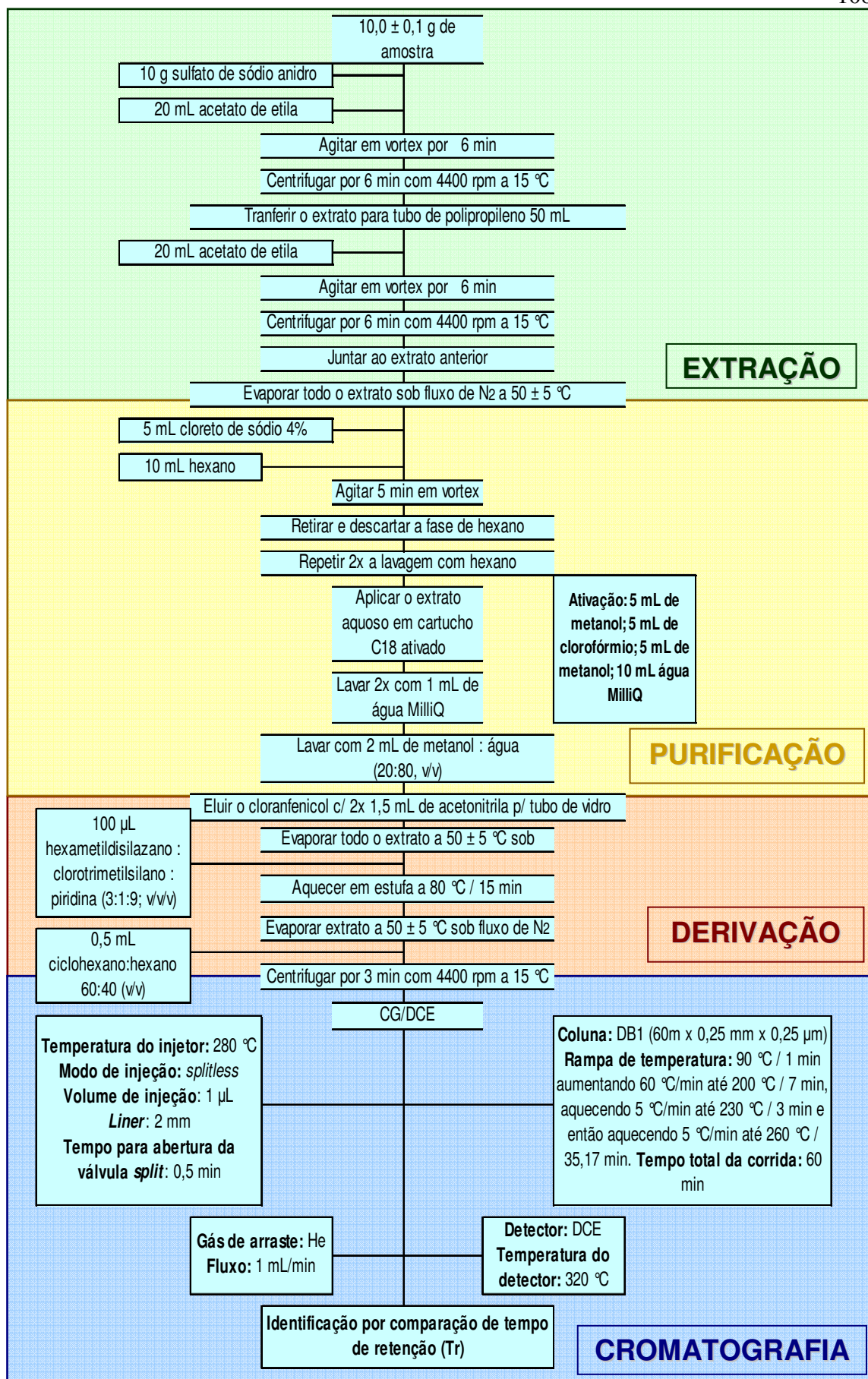


Figura 33. Fluxograma do método completo otimizado para a determinação de resíduos de CAP em carnes caprina e ovina, e leite caprino.

4. CONCLUSÕES

Por meio dos ensaios realizados com soluções padrões de CAP silanizado foi possível determinar que as condições de silanização e de *splitless* para obter maior sensibilidade do CG/DCE devem ser: utilizar o CAP liofilizado e em condições de baixa umidade para silanização durante 15 min a 80 °C; e usar o *splitless* com um *liner* de 2 mm e com a abertura da válvula *split* em 0,5 min. Através dos estudos com as matrizes foi possível determinar o melhor método de extração e purificação a ser adotado e otimizar a eficiência da separação cromatográfica por meio de alterações no comprimento da coluna e nas temperaturas de análise. Foi definido que a melhor condição de purificação foi obtida por lavagens com hexano e limpeza com SPE-C18, e deve-se utilizar uma coluna DB1 com 60 m para obter maior eficiência na separação cromatográfica. Pelos ensaios com as diferentes matrizes alimentícias foi possível determinar para quais destas são aplicáveis as condições otimizadas. As condições otimizadas não são indicadas para as matrizes apícolas, camarão, carnes de avestruz e de tilápia devido à presença de co-eluentes nas condições avaliadas. As matrizes pernil caprino, pernil ovino e leite caprino são indicadas para o desenvolvimento de estudos de validação do método aplicando as condições otimizadas para determinar resíduos de CAP.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AIROLDI, C.; FARIAS, R. F. O uso de sílica gel organofuncionalizada como agente sequestrante para metais. **Química Nova**. Campinas, v. 23, n. 4, p. 496-503, 2000.

AKHTAR, M. H.; DANIS, C.; SAUVE, A.; BARRY, C. Gas chromatographic determination of incurred chloramphenicol residues in eggs following optimal extraction. **Journal of Chromatography**. [s.l.], v. 696, p. 123-130, 1995.

ALOMIRAH, H.; AL-MAZEEDI, H.; AL-ZENKI, S.; AL-AATI, T.; AL-OTAIBI, J.; AL-BATEL, M.; SIDHU, J. Prevalence of antimicrobial residues in milk and dairy products in the state of Kuwait. **Journal of Food Quality**. [s.l.], v. 30, p. 745-763, 2007.

AQUINO, F. R.; NUNES, D. S. S. 2003. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Interciência, p. 5-101.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

BRASIL. Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 Set. 2008.

CECCHI, H. M. 2003. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Unicamp, p. 163-190.

CFIA. Canadian Food Inspection Agency. **Report On Pesticides, Agricultural Chemicals, Veterinary Drugs, Environmental Pollutants And Other Impurities**. 2005. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca>>. Acesso em: 15 Jan. 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos**. 1993.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. 1995. **Introdução a métodos cromatográficos**. Unicamp, p. 55-76.

COMMISSION REGULATION. **Official Journal of the European Communities**. L142, 20. 1998. Disponível em: <<http://www.ojec.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

DRUZIAN, J. I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivo de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)**. 2000. 176f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

EUROPEAN COMMUNITY. EC Council Directive 90/642/EEC, November 27, 1990. **Official Journal of European Communities**. Disponível em: <<http://www.ojec.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

FDA. Food and Drug Administration. **National Drug Residue Milk Monitoring Program**. 1997.

GAUDIN, V. & MARIS, P. Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk. **Food and Agricultural Immunology**. France, v. 13, n. 2, p. 77-86, 2001.

HAAGSMA, N.; SCHREUDER, C.; RENSEN, R. A Rapid sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. [s.l.], v. 363, p. 353-359, 1986.

HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, Honey, and urine using liquid chromatography – mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. Norway, v. 24, p. 2477-2486, 2001.

KEUKENS, H. J.; BEEK, W. M.; AERTS, M. M. High-performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and on-line diode array UV-Vis detection. **Journal of Chromatography**. [s.l.], v. 352, p. 445-453, 1986.

LANÇAS, F. M. 1993. **Cromatografia em fase gasosa**. Acta, p. 9-132.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Método nº 203/03, 1999. **Análise de resíduos cloranfenicol em músculo (ave, bovino, eqüino e suíno) por CG/DCE**. 1999.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Método nº 203/01, 2002. **Análise de resíduos cloranfenicol em músculo (ave, bovino, eqüino e suíno) por CLAE-UV**. 2002.

MARTINS JÚNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. V. ; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T. ; WANG, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em tandem (CLAE/EM/EM). **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.

MEDSCAPE. Chloramphenicol. **Drug Reference**. 2008. Disponível em: <<http://www.medscape.com>>. Acesso em: 12 Nov 2007.

MERCOSUL, Mercado Comum do Cone Sul. Resolução nº 57, 1994. **Critérios para a validação de metodologias analíticas para determinação de resíduos de princípios ativos de medicamentos veterinários (RMV) em produtos de origem animal**. 1994.

ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Chromatographia. Switzerland, v. 59, p. 61-64, 2004.

PENA, A. L. S.; SILVEIRA, M. I. N.; CASTILHO, B. Antibióticos em alimentos: determinação e quantificação por HPLC com detecção fluorimétrica. **Ars**

Pharmaceutica. [s.l.], v. 38, p. 27-37, 1997.

PIZZUTTI, I. R.; SCHWERZ, L.; VIARO, N. S. S.; ADAIME, M. B. Estudo da determinação dos grupos silanóis (-Si-OH) em sílica - Aplicação à materiais de recheio utilizados em cromatografia gasosa. **Química Nova**. Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 267-269, 1997.

REYNAUD, F. **Mecanismo de interação cromatográfica da quitina complexada com íons Fe, na separação de compostos fenólicos**. 2005. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Educação de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; ANDRADE, R. M. B.; ALMEIDA, M. V. Método multiresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de bauru (sp) usando mel como bio-indicador. **Química Nova**. Bauru, v. 29, n. 5, p. 950-955, 2006.

RODZIEWICZ, L.; ZAWADZKA, L. Rapid determination of chloramphenicol residues in Milk powder by liquid chromatography-elektrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**. v. 75, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00399140>>. Acesso em: 28 Dez. 2008.

RONNING, H. T.; EINARSEN, K.; ASP, T. N. Determination of chloramphenicol residues I meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**. Norway, n. 1118, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2008.

SIGMA. **SIGMA SIL-A: Instructions for use**. USA: Sigma Chemical Company, 2005.

SIQUEIRA, S. R. R. **Otimização e validação de método analítico para a determinação de cloranfenicol em alimentos de origem animal utilizando a técnica LC-ESI-MS-MS**. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. 2002. **Princípios de análise instrumental**. Oficial da Sociedade Brasileira de Química, p. 101-133.

SUPELCO. **Bulletin 909A: Guide to Derivatization Reagents for GC**. USA: Sigma-Aldrich Company, 1997. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em 15 Jan. 2009.

TENDENCIA, E. A. & PEÑA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**. Philippines, v. 195, p. 193-204, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 01 Dez 2006.

USDA. United States Department of Agriculture. **CAM Method 5.022-3**, 1991.

USDA. United States Department of Agriculture. **Methods of analysis for veterinary drug residues: validation guidelines**, 1998.

USFDA. United States Food and Drug Administration. **Laboratory Information Bulletin (LIB) n° 4290**. 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 01 Nov. 2006.

USFDA. United States Food and Drug Administration. **Laboratory Information Bulletin (LIB) n° 4306**. 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 01 Nov. 2006.

WHO. World Health Organization. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, sixty-second meeting**. 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 15 Out. 2007.

WINSTON, M. L. 1987. **The biology of the Honey Bee**. Harvard University Press, 1987.

ZIEF, M; KISER, R. **Solid Phase Extraction for Sample Preparation**. USA: J.T.Baker. Disponível em: <<http://www.mallbaker.com>>. Acesso em 12 Jan. 2009.

CAPITULO III

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM LEITE CAPRINO POR CG/DCE

RESUMO

A presença de resíduos de cloranfenicol (CAP) em leite caprino pode causar efeitos tóxicos na população. O presente trabalho consistiu na otimização e validação de uma metodologia analítica para a determinação de resíduos de CAP em leite de cabra por CG/DCE. A extração foi feita com acetato de etila e a purificação do extrato foi realizada por lavagens com hexano e com SPE-C18. A identificação foi obtida por comparação de tempo de retenção e por CG/EM, e a quantificação foi realizada por padronização externa. O método foi seletivo, linear ($R^2 = 0,998$), preciso (%RSD = 5,8 - 13,4), exato (Recuperação de 69,87 - 73,71%) e robusto. Os limites de detecção e de quantificação do método foram, respectivamente, 0,030 e 0,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O método foi eficiente para a determinação de resíduos de CAP em leite caprino.

Palavras-chave: resíduos de cloranfenicol, leite caprino, CG/DCE.

ABSTRACT

OPTIMIZATION AND IN-HOUSE VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN GOAT MILK BY GC/ECD

The presence of chloramphenicol residues in goat milk can cause toxic effects in the population. The present work consisted of the optimization and validation of analytical methodology for determination of chloramphenicol residues in goat milk by GC/ECD. The extraction was made with ethyl acetate and the clean-up with hexane washes and with SPE-C18 cleaning. The identification was made by comparison of retention time and GC/MS, and the quantification by external standard. The method was selective, linear (0.998), precise (5.8-13.4%), exact (69.87-73.71%) and robust. The LOD and LOQ of method were 0.030 and 0.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The method was efficient for analysis of chloramphenicol in goat milk.

Keywords: chloramphenicol residues; goat milk; GC/ECD.

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos e outros medicamentos administrados aos animais por via oral, injetados, ou adicionados aos alimentos caracterizam perigos relacionados ao risco de enfermidades de origem alimentar aos humanos (ANVISA, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2003). A monitoração de resíduos de antibióticos em alimentos é uma área de preocupação crescente devido ao seu potencial impacto a saúde humana (GATICA & GESCHE, 2007).

Na prática veterinária e/ou durante processamento, cloranfenicol (CAP) pode ser utilizado como antibiótico contra bactérias infecciosas devido a seu amplo espectro de ação e baixo custo (Figura 1) (KEUKENS *et al*, 1986; AKHTAR *et al*, 1995; NEUHAUS *et al*, 2002). Em humanos, CAP a uma concentração plasmática de 25 µg/mL, já possui uma ação tóxica, induzindo aplasia medular, e, a depender do nível e tempo de exposição pode culminar em um quadro de anemia aplásica (WHO, 2004; MEDSCAPE, 2008). A indução de resistência bacteriana caracteriza mais um risco ao ser humano (TENDENCIA & PEÑA, 2001; SANTOS *et al*, 2007).

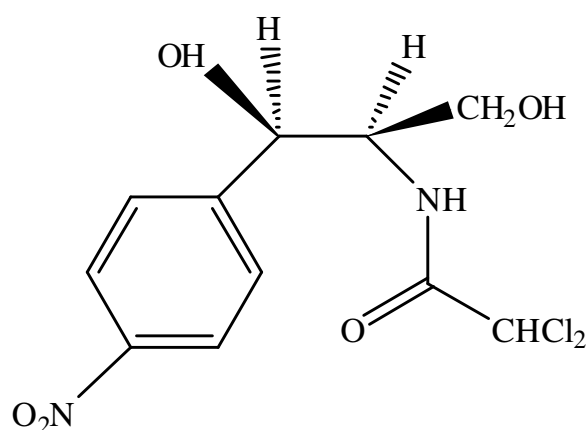


Figura 1. Estrutura química do CAP.

A comprovada presença de resíduos de antibióticos no leite torna necessária a existência de regulamentações e métodos analíticos para controlar esta prática (VASIL, 1999; OMBUI *et al*, 2000; SCHLEGELOVA *et al*, 2002; SHITANDI & STERNESJÖ, 2004). Em 2007 foram isoladas de amostras de leite do Rio de Janeiro diversas espécies de enterococos (*E. faecalis*, *E.*

casseliflavus, *E. faecium*, *E. gallinamm*, *E. durans* e *E. gilvus*) multiresistentes a antimicrobianos (FRACALANZZA *et al*, 2007).

Relatos semelhantes foram determinantes para proibir o uso de CAP em animais que são destinados ou que geram produtos para a alimentação humana em muitos países (ALOMIRAH *et al*, 2007). Na UE, EUA e Canadá o uso de CAP não é autorizado. A Organização Mundial da Saúde também preconiza a não utilização (WHO, 2004). Para o cloranfenicol os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para UE, EUA e Brasil é zero (FDA, 1997; BRASIL, 1998; COMMISSION REGULATION, 1998; SANTOS & RAMOS, 2006).

No Brasil, a Portaria 448/98 do MAPA proíbe o uso de CAP em animais destinados à alimentação humana (BRASIL, 1998). Em 2003, a ANVISA (RDC nº 253) criou o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet) que visa avaliar o potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal (BRASIL, 1998; ANVISA, 2003; BRASIL, 2003b).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) o rebanho nacional de caprinos em 2007 foi estimado em mais que 9 milhões de cabeças. Neste contexto a Bahia destaca-se ocupando o primeiro lugar seguido do Pernambuco e Piauí (IBGE, 2007).

A produção brasileira de leite de cabra alcança 137 mil toneladas (FAO, 2007). Este tem sido recomendado para crianças, pessoas idosas e convalescentes, devido ao alto valor nutricional, boa digestibilidade e baixo potencial alergênico (RIBEIRO & RIBEIRO, 2001). Estas recomendações evidenciam a necessidade de um monitoramento dos resíduos de CAP, assim como o desenvolvimento de métodos eficazes para a determinação deste resíduo na matriz.

Uma grande variedade de estratégias analíticas para extração e determinação de resíduo de CAP de matrizes alimentícias tem sido recentemente empregada. O nível de resíduo aceito está diretamente relacionado ao limite de detecção do método (GATICA & GESCHE, 2007). Métodos que utilizam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE/UV) detectam níveis de até 4,0 µg/kg (LONG *et*

al, 1990; MORETTI *et al*, 1992; LEE *et al*, 2007; SHI *et al*, 2007). Por cromatografia gasosa (CG) detectam-se níveis menores de 1,0 µg/kg (PFENNING *et al*, 1998; SNIEGOCKI *et al*, 2006). Métodos que associam a CLAE com a técnica de espectrometria de massa-massa em *Tandem* (CL/EM/EM) detectam valores de até 0,02 µg/kg (SORENSEN *et al*, 2003; STOREY *et al*, 2003; SNIEGOCKI *et al*, 2007).

Os métodos existentes para a análise de resíduo de CAP em leite têm sido desenvolvidos para leite bovino (GAUDIN & MARIS, 2001; HORMAZABAL & YNDESTAD, 2001; AGUI *et al*, 2002; ALTHAUS *et al*, 2002; ALTHAUS *et al*, 2003; RAMIREZ *et al*, 2003; FERGUSON *et al*, 2005; LIN *et al*, 2005; SCORTICHINI *et al*, 2005; CHAI *et al*, 2006; PEZZA *et al*, 2006; SONG *et al*, 2007), não sendo validados para leite caprino. Portanto, o objetivo do presente estudo foi otimizar e validar, no nível intralaboratorial, a determinação do resíduo de CAP em leite de cabra, utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e Solventes

O padrão de CAP utilizado foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO 63103 USA). O acetato de etila, hexano e ciclohexano (Mallinckrodt Chemicals, USA) e metanol, acetonitrila e clorofórmio (Mallinckrodt Baker, Mexico) utilizados, foram grau pesticida. O cloreto de sódio (QUIMEX, Brasil) e o sulfato de sódio (VETEC, Brasil) utilizados foram grau p.a.. A água foi purificada usando um sistema Milli-Q (Millipore, USA). Os cartuchos de SPE-C18 de 500 mg foram adquiridos da J. T. Baker.

2.2. Equipamentos Cromatográficos

Foram utilizados um cromatógrafo gasoso CP3800 Varian (CG-DCE) com software StarWorkstation versão 6.41; um cromatógrafo gasoso Clarus 500 PerkinElmer (CG-EM) com software TurboMass versão 4.5.0 e biblioteca NIST 98, e injetores *split/splitless*.

2.3. Aquisição de Amostras

Para a otimização e validação da metodologia, foram utilizadas amostras de leite de cabra UHT adquiridas em supermercados de Salvador/BA. As amostras foram identificadas, registradas e armazenadas a -18 °C até o momento da análise, conforme descrito pelo MERCOSUL e *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994).

2.4. Soluções de CAP

A solução padrão estoque foi preparada pela derivação de 1,5 mg do padrão de CAP liofilizado (24 h) com 0,5 mL do reagente Sigma SIL-A (trimetilclorosilano : hexametildisilazano : piridina; 1:3:9; v/v/v) em *vial* âmbar previamente seco em estufa e mantido em dessecador com sílica ativada. A reação se processou por 15 min a 80 °C em estufa. O extrato de CAP derivado foi seco com fluxo de N₂ e diluído com 1,5 mL de ciclohexano:hexano (60:40; v/v) obtendo-se uma solução de 1000 mg/L de CAP silanizado. A partir da diluição desta solução obteve-se uma solução intermediária de 50 µg/L. Por diluições sucessivas desta solução com ciclohexano:hexano (60:40; v/v) obteve-se as soluções padrões nas concentrações de 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 µg/L.

A solução de fortificação para os ensaios de recuperação foi preparada pela diluição do padrão de CAP não silanizado em metanol na concentração de 0,15 µg/mL.

As soluções foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar, mantidas sob atmosfera inerte (N₂) e protegidas da luz a -18 °C, até o momento da análise.

2.5. Extração do analito da matriz

A metodologia de extração do resíduo de CAP foi adaptada a matriz leite caprino com base na metodologia oficial 203/01 do MAPA que segue as normas do MERCOSUL e *Codex Alimentarius* (MAPA, 2002). Foram preparadas alíquotas de $10 \pm 0,1$ g de amostra. O analito foi extraído por duas partições consecutivas com 20 mL de acetato de etila e agitação em vortex por 6 min, e centrifugação a 4400 rpm a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 min para separar o extrato. O extrato obtido foi evaporado sob fluxo de N_2 a $50 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ até aproximadamente 1 mL, e 5 mL de solução de NaCl 4% foram adicionados, seguida de agitação em vortex (1 min). O restante de acetato de etila foi seco com N_2 . Este resíduo foi lavado 3 vezes com 10 mL de hexano (Figura 2).

2.6. Purificação

A solução salina obtida foi aplicada em cartucho C18 previamente ativado com 5 mL de metanol, 5 mL de clorofórmio, 5 mL de metanol e 10 mL de água. Após a aplicação o cartucho foi lavado com 10 mL de água e 5 mL de solução de metanol 20%. O analito foi eluído com 3 mL de acetonitrila para um tubo de vidro (Figura 2).

2.7. Derivação

O extrato purificado foi evaporado até a secura com N_2 a $50 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e silanizado com 100 μL de trimetilclorosilano : hexametildisilazano : piridina (1:3:9; v/v/v) , a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Após a derivação, o extrato silanizado foi seco sob fluxo de N_2 a $50 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e, rapidamente, dissolvido em 0,5mL de ciclohexano:hexano (60:40 v/v). O extrato de CAP silanizado foi agitado em vortex por 1 min e centrifugado por 3 min a 4400 rpm e $15 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo para a análise por CG/DCE (Figura 2).

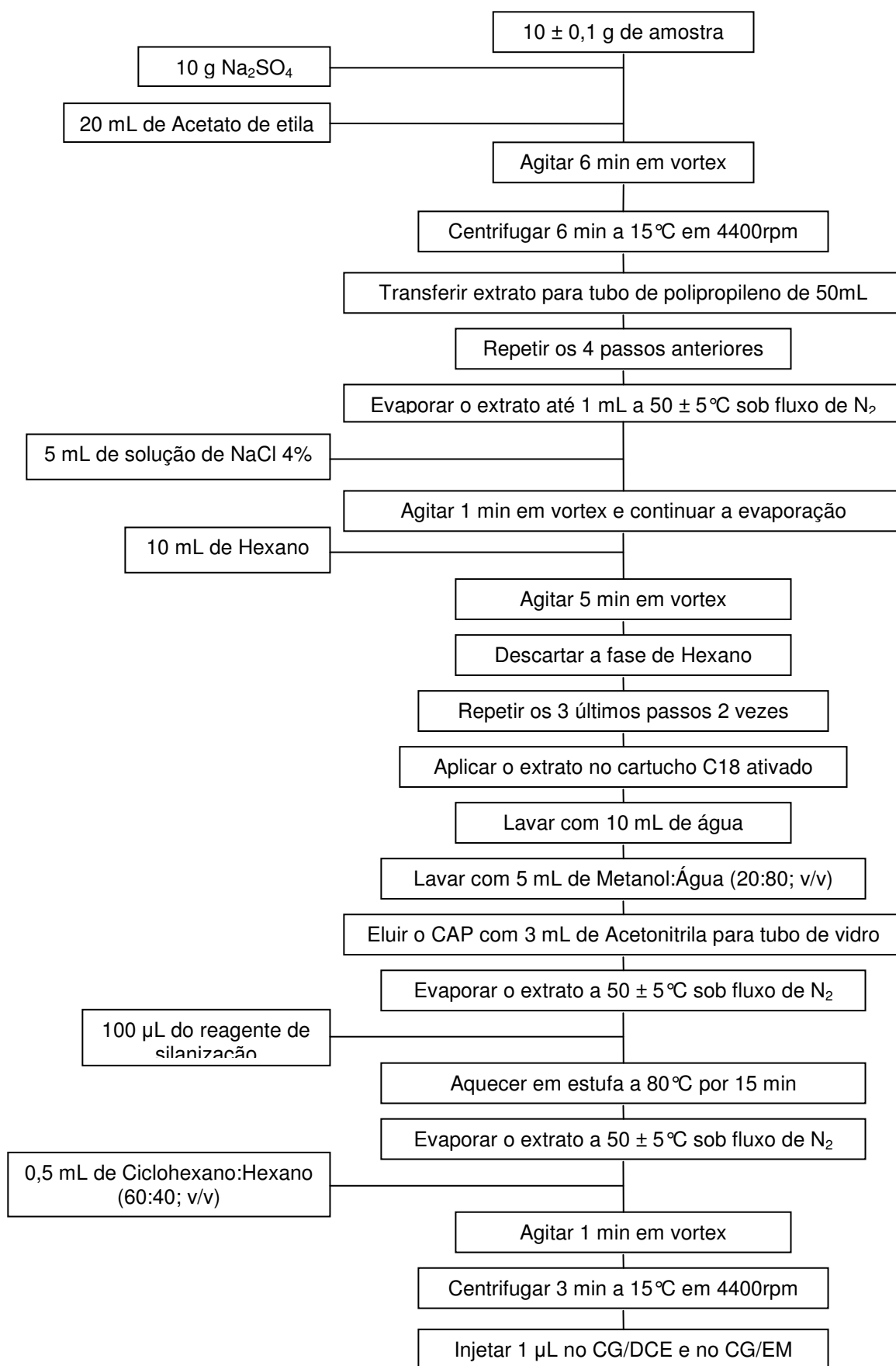


Figura 2. Fluxograma dos procedimentos de extração, purificação e derivação de CAP em amostras de leite caprino.

2.8. Confirmação da derivação por CG/EM

As condições cromatográficas para a identificação conclusiva do CAP silanizado foram: injeção de 1 μ L no modo de injeção *splitless* com *liner* de 2 mm; separação em coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) a 80 $^{\circ}$ C por 1 min, aumentando a 30 $^{\circ}$ C/min até 230 $^{\circ}$ C, permanecendo por 14 min, totalizando 20 min de corrida. O gás de arraste foi Hélio a 1 mL/min. A fragmentação das moléculas foi obtida por ionização por impacto de elétrons (EI) com energia de 70 eV. O espectrômetro de massas foi programado para varredura na faixa de 50 a 550 m/z. As temperaturas da linha de transferência e da fonte de ionização foram, respectivamente, 200 e 180 $^{\circ}$ C.

2.9. Separação, detecção, identificação por comparação de Tr e quantificação

A metodologia para separação e determinação do analito por CG/DCE foi otimizada com base no método 203/03 do MAPA que segue as normas MERCOSUL e USDA (USDA, 1991; MERCOSUL, 1994; USDA, 1998; MAPA, 1999).

Foi injetado 1 μ L do extrato silanizado no modo de injeção *splitless* no CG/DCE. No injetor foi utilizado um *liner* com 2 mm de diâmetro interno. A separação foi realizada com coluna capilar DB-1 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) sob as seguintes condições: 90 $^{\circ}$ C durante 1 min aumentando a 60 $^{\circ}$ C/min até 200 $^{\circ}$ C e permanecendo por 3 min, 5 $^{\circ}$ C/min até atingir 230 $^{\circ}$ C e permanecendo por 3 min e, por fim, aumentando 5 $^{\circ}$ C/min até 260 $^{\circ}$ C onde permaneceu por 35,17 min, totalizando 60 min de corrida. O gás de arraste utilizado foi Hélio a 1 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente 280 e 320 $^{\circ}$ C. A identificação do resíduo foi realizada por comparação de tempo de retenção (Tr) e a quantificação foi realizada por padronização externa.

2.10. Procedimentos de validação

Os ensaios de validação foram realizados por CG/DCE seguindo os parâmetros descritos pelas normas brasileiras e internacionais (CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994; BRASIL, 2003a).

Para a linearidade (curva padrão externo) foram empregadas soluções de CAP silanizado a 0,3125; 0,6250; 1,250; 2,500 e 5,000 µg/L, injetadas em triplicata. A origem foi incluída na curva padrão (BRASIL, 2003a; LANÇAS, 2004).

Foram pesadas alíquotas de $10 \pm 0,1$ g de amostras de leite caprino e estas foram fortificadas, em três repetições, com 20, 100 e 200 µL da solução de CAP de 0,15 µg/mL, equivalentes a contaminações de 0,30; 1,5 e 3,0 µg/kg, respectivamente. A cada grupo de amostras fortificadas destinadas à análise foi incluída uma amostra em branco (não fortificada) para confirmação da não detecção do analito. Através destes ensaios foi avaliada a seletividade, exatidão, precisão e robustez do método (BRASIL, 2003a). A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-dia (repetitividade) com triplicatas em três concentrações distintas; e precisão intermediária com as variáveis analistas e dias também em triplicatas.

Para determinar os limites de detecção e quantificação do método foram realizados ensaios com amostras fortificadas em concentrações decrescentes a partir de 0,30 µg/kg (BRASIL, 2003a; RIBANI *et al*, 2004).

Para a robustez foram avaliadas duas variáveis: a massa de sulfato de sódio (7, 10 e 13 g) e o tempo de derivação do extrato (10, 15 e 20 min) (Figura 2).

Os resultados obtidos foram avaliados pelo tratamento estatístico da ANOVA pelo software Microsoft Office Excel 2003.

2.11. Valores de referência

Os valores adotados como referência para avaliação da exatidão e precisão foram os estabelecidos como aceitáveis pelo MERCOSUL e *Codex Alimentarius* (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de referência adotados para exatidão e precisão segundo a faixa de concentração de resíduo estabelecida pelo *Codex Alimentarius* e MERCOSUL.

Concentração (µg/kg ou L)	Exatidão (%)	Precisão (%RSD)
≤ 1	50 a 120	35
1 a 10	60 a 120	30

Fonte: (CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre 2004-2005 o PAMVet fez o monitoramento de CAP em 306 amostras de leite bovino em pó e UHT coletadas em diversos estados do Brasil por métodos de imunoensoaios, encontrando 22 amostras contaminadas. Isto demonstra a necessidade da validação de métodos alternativos que permitem a determinação do resíduo (ANVISA, 2006). O PAMVet indica a utilização das técnicas de CG/DCE e CG/EM para a determinação de CAP em leite bovino (ANVISA, 2003), porém para leite caprino este é o primeiro estudo de validação.

3.1. Extração do analito da matriz

O hexano foi o solvente usado para a remoção dos lipídios do extrato (Figura 2). Conforme observado em outros estudos com leite bovino e outras matrizes (LI *et al*, 2001; PEREZ *et al*, 2002; GANTVERG *et al*, 2003; RODZIEWICZ & ZAWADZKA, 2008), constatou-se também no presente trabalho que as etapas de extração com hexano foram suficientes para a purificação do extrato, obtendo-se extratos extremamente límpidos, sem resíduos de gorduras, possibilitando o desenvolvimento de um procedimento simples para a retirada da gordura por partição.

A maioria dos métodos existentes para a determinação de resíduos de CAP nas mais diferentes matrizes faz a extração da parte lipídica das amostras com solventes orgânicos apolares (SIQUEIRA, 2007). Este processo geralmente é

realizado utilizando-se hexano, clorofórmio e/ou heptano (WHO, 2004; SIQUEIRA, 2007). Esta etapa é crucial, pois a presença de gorduras pode diminuir a eficiência do processo de purificação devido à competição entre os lipídios e o CAP pelos sítios ativos da coluna C18.

Para a purificação por *SPE* C18 é importante que as etapas de lavagem e eluição do cartucho se processem sob ação da gravidade (MAPA, 1999). A redução da pressão com o auxílio de uma bomba de vácuo somente foi utilizada após a lavagem com água para auxiliar a secagem do cartucho.

Em todas as etapas de secagem dos extratos a evaporação deve ser feita sob um fluxo brando de N₂ e sob constante observação (MAPA, 1999), pois a secagem excessiva pode acarretar na perda do CAP.

3.2. Análise qualitativa

O CG/EM com EI não possui sensibilidade compatível ao CG/DCE. O DCE é mais sensível permitindo detectar níveis inferiores a 1 µg/kg de CAP. Portanto, nas condições cromatográficas definidas para o CG/EM foi possível detectar CAP silanizado somente na concentração de 3 mg/mL resultando um Tr de 13,5 min. Esta concentração é 6×10^5 vezes maior que a maior concentração (5 µg/L) usada na curva de calibração do CG/DCE. A identificação foi confirmada pela comparação entre o espectro de massas obtido com o espectro da biblioteca NIST. Pela análise do espectro obtido constatou-se que o método de derivação do CAP é eficaz, obtendo-se o O,O-Bis-(Tri-Metil-Silil)-Cloranfenicol como produto da silanização (Figura 3).

As soluções de CAP, os extratos da matriz em branco e fortificado depois de silanizados foram analisados por CG/DCE. Sob as condições cromatográficas definidas o valor do Tr do CAP silanizado foi de 36,6 min, e nestas condições nenhum co-eluyente foi identificado (Figura 4).

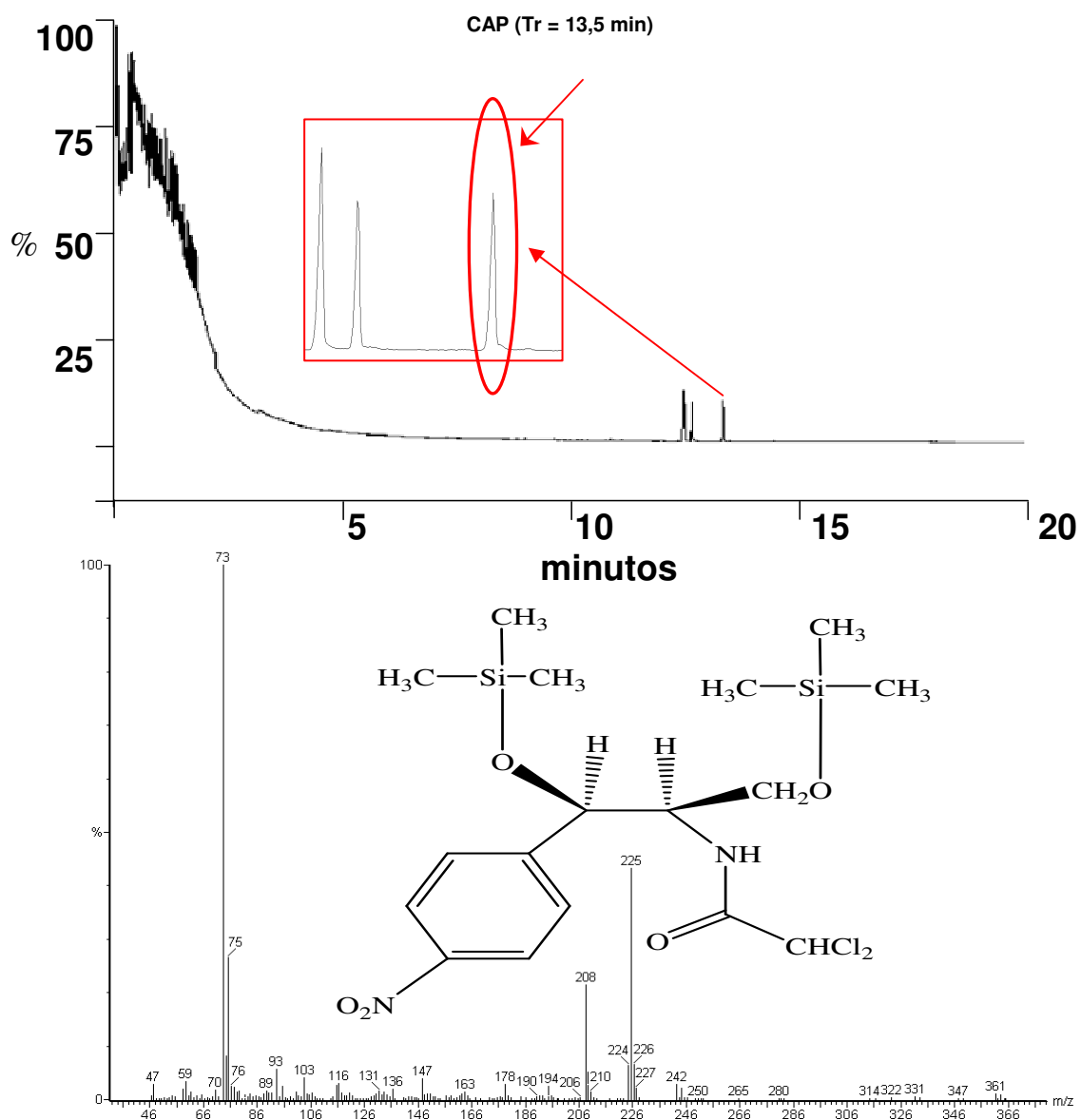


Figura 3. Identificação do CAP silanizado por CG/EM: (A) Cromatograma da solução padrão CAP silanizado (3 mg/mL); (B) Espectro de massas obtido e estrutura do CAP Bis-silanizado.

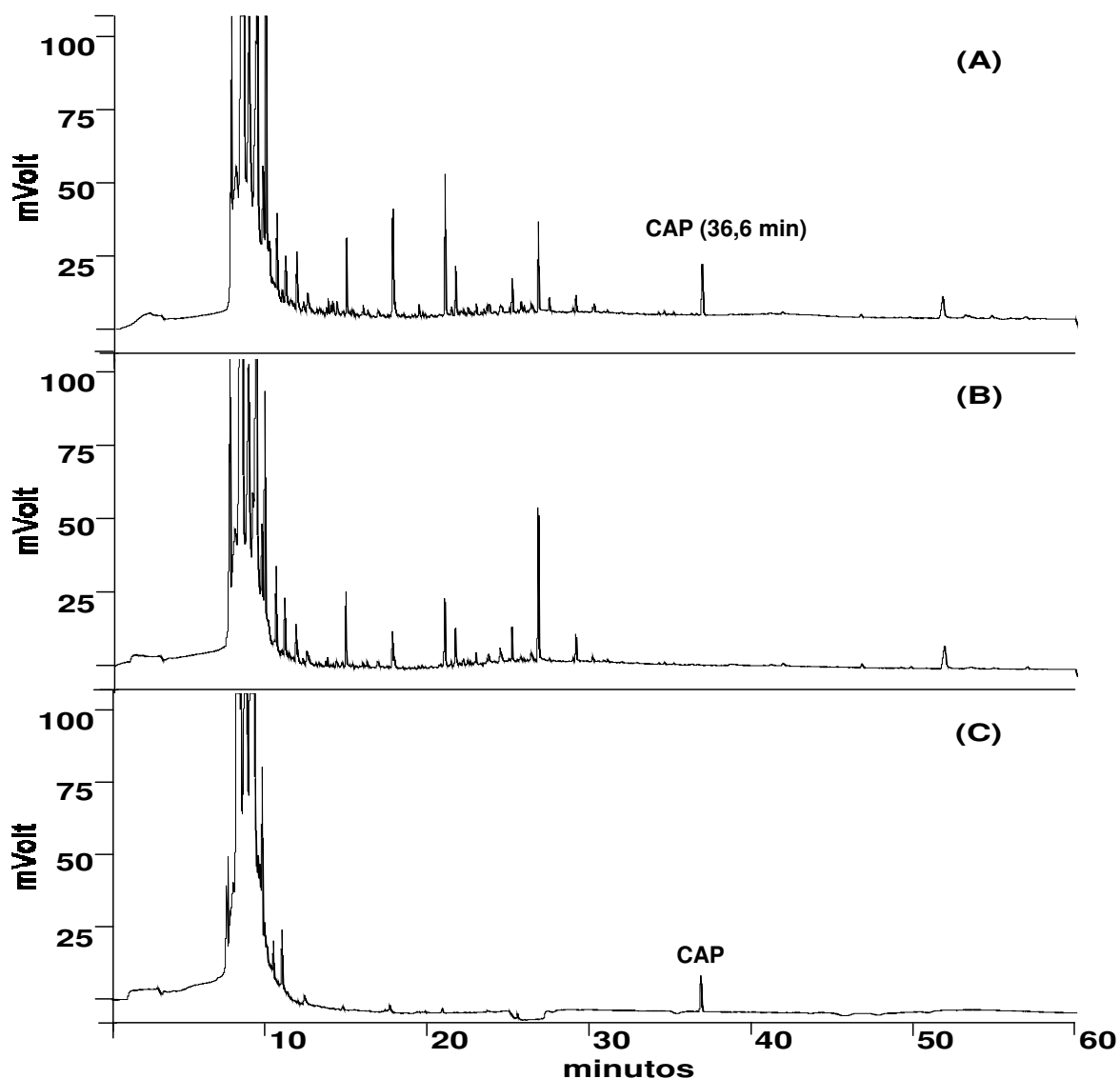


Figura 4. Cromatogramas obtidos por CG/DCE da amostra leite de cabra: (A) Amostra fortificada com 1,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de CAP; (B) Amostra em branco; (C) Padrão de 1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de CAP silanizado.

3.3. Validação do método analítico

3.3.1. Especificidade

De acordo com os cromatogramas do branco da matriz, do padrão de CAP, e da matriz fortificada evidencia-se a seletividade do método, pela ausência da detecção de picos no Tr do analito (Figura 4). O método proposto demonstrou ser seletivo e específico, não sendo afetado pelos outros constituintes da matriz ou por interferentes dos reagentes e solventes.

3.3.2. Linearidade

Para a quantificação empregou-se o método da padronização externa visando obter análises com menores custo e tempo de análise. A linearidade de um método mostra quanto os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

Os valores das áreas dos picos das soluções de CAP silanizado versus as concentrações foram utilizados para aplicar a regressão linear via método dos mínimos quadrados. A curva padrão externo obtida no CG/DCE com cinco níveis de calibração injetados em triplicata resultou uma equação de reta ($y = 5200,3x - 382,43$) com coeficiente de correlação (R^2) de 0,998 (Figura 5). De acordo com os critérios de aceitabilidade dos resultados o coeficiente de correlação da curva de calibração (R^2) deve ser $\geq 0,995$ (CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994; BRASIL, 2003a). Os valores de linearidade obtidos em outros métodos que fizeram a quantificação por padronização interna são similares (Tabela 2). Portanto, o valor do coeficiente de correlação obtido por padronização externa (0,998) é satisfatório.

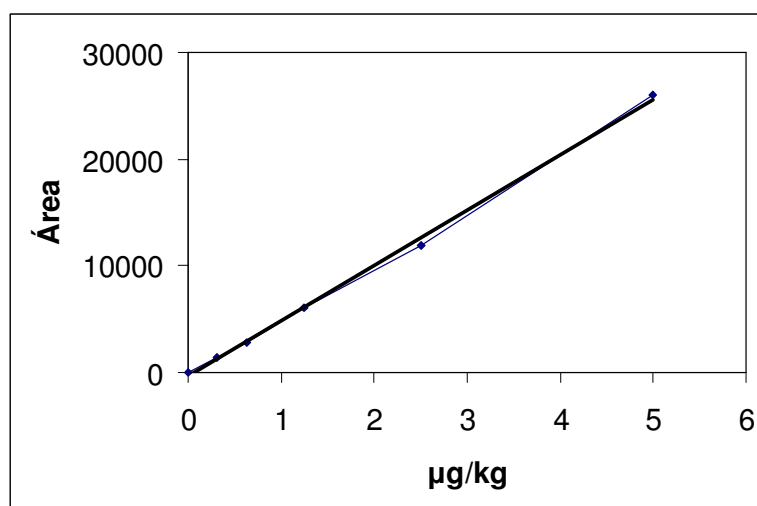


Figura 5. Curva de calibração padrão externo de CAP silanizado (área x concentração em µg/kg) obtida por CG/DCE. $y = 5200,3x - 382,43$ e $R^2 = 0,998$.

3.3.3. Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada pela variação entre resultados obtidos em medidas sucessivas do teor de CAP no leite caprino fortificado, sendo avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD) ou também chamado de coeficiente de variação (CV) (LANÇAS, 2004). Segundo o MERCOSUL (1994) e o *Codex Alimentarius* (1993), para as faixas de concentrações analisadas o RSD indicado pode atingir 35% para concentrações menores que 1 µg/kg, e até 30% para concentrações entre 1 e 10 µg/kg. Para a repetitividade, o método apresentou-se preciso nos três níveis de concentração avaliados, obtendo-se valores de RSD inferiores a 14% (Tabela 3). Por comparação dos dados de precisão (5,8 a 13,4%) e exatidão (69,87 a 73,71%) deste estudo com os obtidos em outros métodos de validação de resíduo de CAP em leite bovino por técnicas mais sensíveis, constata-se similaridade (2,1 a 25 %) (Tabela 2). Portanto evidencia-se que o emprego do CG-DCE nas condições utilizadas no presente método de validação permite atingir níveis de sensibilidade próximos a métodos que utilizam técnicas como CL/EM/EM e CG/EM/EM.

Tabela 2. Comparação entre os parâmetros de validação obtidos pelo presente método para leite caprino e os valores encontrados na literatura para leite bovino.

Referência	Técnica Aplicada	Extração	Purificação	R ²	Exatidão (%)	Precisão (%RSD)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Presente Estudo	CG/DCE ^a	Acetato de Etila	SPE C18	0,998	69,87 - 73,71	5,8 - 13,4	0,030	0,100
PFENNING <i>et al</i> (1998)	CG/DCE ^a	Acetonitrila	SPE C18	0,9995	76,4 - 99,8	1,8 - 10,9	1,0	5,0
SNIEGOCKI <i>et al</i> (2006)	CG/EM/EM ^b	Acetonitrila	SPE C18	0,979	61,9 - 78	7,8 - 15	0,083	0,140
SNIEGOCKI <i>et al</i> (2007)	CL/EM/EM ^c	Acetonitrila	SPE C18	0,9605	91,3 - 92,1	2,9 - 15,2	0,110	0,150
RODZIEWICZ & ZAWADZKA (2008)	CL/EM/EM ^c	Acetato de Etila	Não utilizou	0,998	-	12 - 15	0,090	0,110
NICOLICH <i>et al</i> (2006)	CL/EM/EM ^c	Acetato de Etila	Não utilizou	0,980	80,57 - 107,72	2,76 - 16,76	0,050	0,090
RONNING <i>et al</i> (2006)	CL/EM/EM ^c	Acetonitrila	Não utilizou	0,999	-	12 - 25	0,020	0,040
GUY <i>et al</i> (2004)	CL/EM/EM ^c	Acido tricloroacético 10%	SPE HLB	0,999	98 - 112	-	0,020	0,030
SORENSEN <i>et al</i> (2003)	CL/EM/EM ^c	SPE C18	Óxido Neutro de Alumínio	0,9999	90	2,8 - 4,3	-	0,030
HUANG <i>et al</i> (2006)	CL/EM ^d	Tampão Fosfato pH 4.0	PMNE ^e	0,998	93,4 - 100	2,1 - 8,9	0,040	0,14
HORMAZABAL & YNDESTAD (2001)	CL/EM ^d	Acetonitrila	SPE LMS	0,999	95 - 99	0,5-1,5	0,5	1,000

^a Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons

^b Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas em *Tandem*

^c Cromatografia Líquida com Detecção por Espectrometria de Massas em *Tandem*

^d Cromatografia Líquida com Detecção por Espectrometria de Massas

^e Micro-extração com Polímero Monolítico

- Dados não fornecidos.

Tabela 3. Comparação da exatidão e da precisão intra-dia obtidas com valores de referência adotados.

Nível de fortificação (µg/kg)	Exatidão Média (%)	Precisão intra-dia (%RSD)	Exatidão de Referência* (%)	Precisão de Referência* (%RSD)
0,30	73,71	6,54	50 - 120	35
1,50	69,87	5,80	60 - 120	30
3,00	70,40	13,40		

* (CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994)

Para a precisão intermediária (Tabela 4), os resultados entre diferentes dias e analistas foram avaliados pelo tratamento estatístico ANOVA. Para os dois parâmetros o valor do *P* foi maior que 0,05, indicando que o método não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dados das duas variáveis testadas com 95 % de confiança.

Tabela 4. Avaliação da precisão intermediária pelas variáveis “dia” e “analista”.

Variáveis		Média (%RSD)	<i>P</i> *
Dia	1	73,71	0,617965
	2	70,41	
Analista	1	70,41	0,93223
	2	69,87	

* $P > 0,05$ – Sem diferença significativa.

A exatidão de um método mede quanto o resultado de um dado método analítico se aproxima do resultado real previamente definido (RIBANI *et al*, 2004). Para a validação do método de resíduo de CAP em leite de cabra a exatidão foi medida através da porcentagem de recuperação do composto de interesse que foram adicionados na amostra nas concentrações de 0,30; 1,50 e 3,00 µg/kg. Nos ensaios com amostras fortificadas, as recuperações médias obtidas variaram de 69,87 a 73,71 % (Tabela 3). De acordo com os critérios de aceitabilidade dos resultados estabelecidos pela literatura (CODEX ALIMENTARIUS, 1993; MERCOSUL, 1994; BRASIL, 2003a), a porcentagem

de recuperação obtida pela metodologia implantada está dentro dos limites exigidos pelas normas (Tabela 3).

Comparando-se os dados da exatidão com os dados obtidos em outros métodos de validação de resíduo de CAP em leite bovino por CL/EM/EM e CG/EM/EM, constatam-se valores similares (61,9 a 92 %) (Tabela 2). Recuperações entre 60 e 90 % são normais e esperadas em métodos que envolvem etapas de derivação, como as necessárias para a análise de CAP por CG, que podem acarretar em maior perda do analito durante preparo da amostra culminando em uma menor exatidão (PFENNING *et al*, 1998; SNIEMOCKI *et al*, 2006). O contrário é observado para os métodos que utilizam a técnica de cromatografia líquida (80,57 a 112 %), onde não é necessária a realização da derivação do CAP (SORENSEN *et al*, 2003; GUY *et al*, 2004; HUANG *et al*, 2006; JUNIOR *et al*, 2006; NICOLICH *et al*, 2006).

3.3.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) determinado através da razão entre sinal:ruído (3:1) foi de 0,03 µg/kg, e o limite de quantificação (LQ) determinado pela relação sinal:ruído (10:1) foi de 0,10 µg/kg.

Os valores do LD e LQ obtidos são similares aos resultados obtidos por outros métodos para a matriz leite bovino por CL/EM/EM e CG/EM/EM, que estão na faixa de 0,02 a 0,11 µg/kg para o LD e de 0,03 a 1 µg/kg para o LQ (Tabela 2). Foram encontrados apenas que três métodos que resultaram um LD e LQ menores que o do presente estudo. Vale ressaltar, que estes métodos empregaram procedimentos de extração diferentes (partição com acetonitrila (RONNING *et al*, 2006), partição com ácido tricloroacético 10% (GUY *et al*, 2004) e SPE C18 (SORENSEN *et al*, 2003)), e os procedimentos de purificação também foram distintos (SPE HLB (GUY *et al*, 2004) e Oxido Neutro de Alumínio (SORENSEN *et al*, 2003)) ou ausentes (RONNING *et al*, 2006). Estas modificações podem ter influenciado a capacidade de recuperação do analito tendo em vista que os valores da exatidão também foram superiores e, conseqüentemente, os da detecção.

Comparando-se os dados de LD e LQ obtidos neste estudo com os dados da única referência encontrada que utilizou a técnica de CG/DCE para a

determinação de CAP em leite bovino (PFENNING, 1998) (Tabela 2), observa-se que o LD e LQ obtidos no presente estudo (0,03 e 0,1 µg/kg) são cerca de 30 vezes maior para o LD e 50 vezes maior para o LQ.

3.3.5. Robustez

Um método robusto tem a habilidade de fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças. Pela análise estatística dos resultados foi verificado que o valor obtido para o *F calculado* foi maior que o *F tabelado* para a variável massa de sulfato de sódio empregado na etapa de extração (Figura 2), demonstrando que este é um ponto crítico para o método proposto de determinação de resíduo de CAP em leite de cabra (Tabela 5). Para a variável tempo de derivação do extrato o valor obtido para o *F calculado* foi inferior ao do *F tabelado*, determinando com 95% de confiança que o método é robusto para esta variável (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação estatística da robustez pelas variáveis “massa de Na₂SO₄” e “tempo de derivação do extrato”.

Variáveis		Recuperação Média ± CV* (%)	<i>F calculado</i>	<i>F tabelado</i> (0,95)
Massa de Na ₂ SO ₄ (g ± 0,1)	7	72,53 ± 2,92	27,30801	5,143253
	10	73,71 ± 6,54		
	13	55,23 ± 4,96		
Tempo de derivação (min)	10	74,62 ± 4,19	0,304138	
	15	73,71 ± 6,54		
	20	72,29 ± 3,86		

* CV - Coeficiente de variação de triplicatas.

Os resultados da presente validação para a quantificação por CG/DCE de resíduos de CAP de leite caprino mostraram que os parâmetros de validação (especificidade, linearidade, exatidão, precisão, LD, LQ e robustez) são similares aos obtidos por métodos que usam técnicas mais sensíveis como a CL/EM/EM e CG/EM/EM para leite bovino. O método proposto reduz os custos e a demanda de tempo da análise por utilizar padronização externa. Além disso, deve-se considerar que a técnica de CG/DCE é mais amplamente difundida nos laboratórios de análises. Portanto, o presente estudo demonstra

que é possível a determinação de CAP em leite caprino por CG/DCE de modo compatível com as técnicas de CL/EM/EM e CG/EM/EM, reduzindo a necessidade de investimentos para aquisição de novos equipamentos e para treinamento de profissionais. O método desenvolvido possui sensibilidade compatível com as técnicas CL/EM/EM e CG/EM/EM, podendo ser utilizado como uma técnica altamente sensível para determinação de resíduos de CAP em leite caprino.

4. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado intralaboratorialmente um método alternativo utilizando a técnica de CG/DCE para a determinação quantitativa de resíduo de cloranfenicol em matriz de leite caprino. O procedimento analítico proposto mostrou-se preciso, exato, atendendo aos critérios de aceitabilidade estabelecidos pelo MERCOSUL e *Codex Alimentarius*. O método proposto utiliza a vantagem da alta sensibilidade do DCE para compostos halogenados, sendo uma alternativa para monitoramento e/ou *screening* de resíduos de CAP em leite caprino para laboratórios que não possuem as técnicas CL/EM/EM ou CG/EM/EM de alto custo de aquisição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUI, L.; GUZMÁN, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Voltammetric determination of chloramphenicol in Milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. **Analytica Chimica Acta**. Madrid, v. 461, p. 65-73, 2002.
- AKHTAR, M. H.; DANIS, C.; SAUVE, A.; BARRY, C. Gas chromatographic determination of incurred chloramphenicol residues in eggs following optimal extraction. **Journal of Chromatography**. [s.l.], v. 696, p. 123-130, 1995.
- ALOMIRAH, H.; AL-MAZEEDI, H.; AL-ZENKI, S.; AL-AATI, T.; AL-OTAIBI, J.; AL-BATEL, M.; SIDHU, J. Prevalence of antimicrobial residues in milk and dairy products in the state of Kuwait. **Journal of Food Quality**. v. 30, p. 745-763, 2007.

ALTHAUS, R. L.; PERIS, C.; MONTERO, A.; TORRES, A.; MOLINA, P. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest. **Milchwissenschaft-milk Science International**. Valencia, v. 57, p. 660-664, 2002.

ALTHAUS, R. L.; TORRES, A.; MONTERO, A.; BALASCH, S.; MOLINA, M. P. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by Delvotest Photometric Measurements. **Journal of Dairy Science**. Valencia, v. 86, p. 457-463, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)**. 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório 2004/2005-Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo**. 2006. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 Nov. 2008.

BRASIL. Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 28 Nov. 2007.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003a. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

BRASIL. Resolução RDC n. 253, de 16 de setembro de 2003b. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

CHAI, C.; XU, M.; LIU, G. Effect of cationic surfactant on the voltammetric determination of chloramphenicol residue in Milk. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. Shanghai, v. 34, p. 1715-1718, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. **Resíduos de medicamentos veterinários en los alimentos**. 1993.

COMMISSION REGULATION. **Official Journal of the European Communities**. L142, 20. 1998. Disponível em: <<http://www.ojec.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

EUROPEAN COMMISSION. **Official Journal of the European Union**. L71/17. 2003. Disponível em: <<http://www.ojec.com>>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

FAO. Goat milk: Production Quantity. **FAOSTAT**. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 15 Dez. 2008.

FDA. Food and Drug Administration. **National Drug Residue Milk Monitoring Program**. 1997.

FERGUSON, J.; BAXTER, A.; YOUNG, P.; KENNEDY, G.; ELLIOTT, C.; WEIGEL, S.; GATERMANN, R.; ASHWIN, H.; STEAD, S.; SHAMAN, M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and Milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex[®] kit chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**. Northern Ireland, v. 529, p. 109-113, 2005.

FRACALANZZA, S. A. P.; SCHEIDEGGER, E. M. D.; SANTOS, P. F.; LEITE, P. C.; TEIXEIRA, L. M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized Milk in Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 102, p. 853-859, 2007.

GANTVERG, A.; SHISHANI, I.; HOFFMANN, M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine. **Analytica Chimica Acta**. Canadá, v. 483, p. 125-135, 2003.

GATICA, C. P. & GESCHE, E. R. Método de las 5 placas para la detección de residuos de antibacterianos em leche. **Revista Científica (Maracaíbo)**. Chile, v. 17, n° 3, p. 231-238, 2007.

GAUDIN, V. & MARIS, P. Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk. **Food and Agricultural Immunology**. France, v. 13, n° 2, p. 77-86, 2001.

GUY, P. A.; DELPHINE, R.; MOTTIER, P.; GREMAUD, E.; PERISSET, A.; STADLER, R. H. Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. Switzerland, v. 1054, p.365-371, 2004.

HORMAZABAL, V. & YNDESTAD, M. Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, honey, and urine using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. Norway, v. 24, n° 16, p. 2477-2486, 2001.

HUANG, J. F.; ZHANG, H. J.; FENG, Y. Q. Chloramphenicol extraction from honey, milk and eggs using polymer monolith microextraction followed by liquid

chromatography-mass spectrometry determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. China, v.54, p. 9279-9286, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário de 2007**. 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 06 Dez. 2008.

JUNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “*tandem*” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.

KEUKENS, H. J.; AERTS, M. M. L.; TRAGA, W. A. Determination of chloramphenicol residues in aquatic products by gas chromatography. **Journal of AOAC International**. [s.l.], v. 75, p. 245-256, 1992.

LANÇAS, F. M. 2004. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. Rima, p. 1-34.

LEE, J. B.; CHUNG, H. H.; CHUNG, Y. H.; LEE, K. G. Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods. **Food Chemistry**. Korea, v. 105, p. 1726-1731, 2007.

LI, T. L.; CHUNG-WANG, Y. J.; SHIH, Y. C. Determination and confirmation of chloramphenicol residues in swine muscle and liver. **Journal of Food Science**. Taiwan, v. 67, p. 21-28, 2001.

LIN, S. H.; HAN, S. Q.; LIU, Y. B.; XU, W. G.; GUAN, G. Y. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. China, v. 382, p. 1250-1255, 2005.

LONG, A. R.; HSIEH, L. C. ; BELLO, A. C. ; MALBROUGH, M. S.; SHORT, C. R.; BARKER, S. A. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Louisiana, v. 38, p. 427-429, 1990.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Método nº 203/03, 1999. **Análise de resíduos cloranfenicol em músculo (ave, bovino, eqüino e suíno) por CG/DCE**. 1999.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Método nº 203/01, 2002. **Análise de resíduos cloranfenicol em músculo (ave, bovino, eqüino e suíno) por CLAE-UV**. 2002.

MEDSCAPE. Chloramphenicol. **Drug Reference**. 2008. Disponível em: <<http://www.medscape.com>>. Acesso em: 12 Nov 2008.

MERCOSUL, Mercado Comum do Cone Sul. Resolução n° 57, 1994. **Critérios para a validação de metodologias analíticas para determinação de resíduos de princípios ativos de medicamentos veterinários (RMV) em produtos de origem animal**. 1994.

MORETTI, V. M.; VANDEWATER, C.; HAAGSMA, N. Automated high performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk and swine muscle tissue using online immunoaffinity sample cleanup. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**. V. 583, p. 77-82, 1992.

NEUHAUS, B. K.; HURLBUT, J. A.; HAMMACK, W. LC MS/MS analysis of CAP in shrimp. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4290**. Bothell, v. 18, n. 9, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

NICOLICH, R. S.; BARROSOS, E. W.; MARQUES, M. A. S. Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by HPLC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**. Rio de Janeiro, v. 565, p. 97-102, 2006.

OMBUI, J. N.; KIMOTHO, A. M.; NDUHIU, J. G. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. **East African Medical Journal**. Kenya, v. 77, p. 463-467, 2000.

PEREZ, N.; GUTIERREZ, R. ; NOA, M. ; DIA, G. ; LUNA, H. ; ESCOBAR, I. ; MUNIVE, Z. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamides, nitrofurans and chloramphenicol residues in pasteurized milk. **Journal of AOAC International**. v. 85, p. 20-24, 2002.

PEZZA, L.; RÍOS, À.; NOZAL, L.; ARCE, L.; VALCÁRCEL, M. Determinação simultânea de resíduos de cloranfenicol, tiamfenicol e florfenicol em leite bovino por cromatografia eletrocínética micelar. **Química Nova**. Araraquara, v. 29, n° 5, p. 926-931, 2006.

PFENNING, A. P.; MADSON, M. R.; ROYBAL, J. E.; TURNIPSEED, S. B.; GONZALES, S. A.; HURLBUT, J. A.; SALMON, G. D. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. **Journal of AOAC International**. Denver, v. 81, p. 714-720, 1998.

RAMIREZ, A. ; GUTIÉRREZ, R. ; DÍAZ, G. ; GONZÁLEZ, C.; PÉREZ, N.; VEGA, S.; NOA, M. Highperformance thin layer chromatography bioautography

for multiple antibiotic residues in cow's milk. **Journal of Chromatography B**. Mexico, v. 784, p. 315-322, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, E. L. A. & RIBEIRO, H. J. S. S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 22, p. 229-235, 2001.

RODZIEWICZ, L. & ZAWADZKA, I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography–elektrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**. Poland, v. 75, p. 846-850, 2008.

RONNING, H. T.; EINARSEN, K.; ASP, T. N. Determination of chloramphenicol residues I meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**. Norway, n. 1118, 2006.

SANTOS, U.; RAMOS, F. Analytical methodologies for chloramphenicol residues determination in food matrixes: A brief review. **Current Pharmaceutical Analysis**. V. 2, p. 53-57, 2006.

SANTOS, S. M.; HENRIQUES, M.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. **Talanta**. Portugal, v. 71, p. 731-737, 2007.

SCHLEGELOVA, J.; BABÁK, V.; KLÍMOVÁ, E.; LUKÁSOVÁ, J.; NAVRÁTILOVÁ, P.; SUSTÁCKOVÁ, A.; SEDIVÁ, I.; RYSÁNEK, D. Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. Hudcova, v. 49, p. 216-225, 2002.

SCORTICHINI, G.; ANNUNZIATA, L.; HAOUET, M. N.; BENEDETTI, F.; KRUSTEVA, I.; GALARINI, R. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. **Analytica Chimica Acta**. Italy, v. 535, p. 43-48, 2005.

SHI, X.; WU, A.; ZHENG, S.; LI, R.; ZHANG, D. Molecularly imprinted polymer microspheres for solid phase extraction of chloramphenicol residues in foods. **Journal of Chromatography B**. China, v. 850, p. 24-30, 2007.

SHITANDI, A. & STERNESJÖ, A. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large and small scale produces in Kenya. **Journal of Dairy Science**. Kenya, v. 87, p. 4145-4149, 2004.

SIQUEIRA, S. R. R. **Otimização e validação de método analítico para a determinação de cloranfenicol em alimentos de origem animal utilizando a técnica LC-ESI-MS-MS**. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SNIEGOCKI, T.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Validation of the gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of chloramphenicol residues in milk. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. Poland, v. 50, p. 353-357, 2006.

SNIEGOCKI, T.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Determination of chloramphenicol residues in milk by gas and liquid chromatography mass spectrometry methods. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**. Poland, v. 51, p. 59-64, 2007.

SONG, W. W. ; DING, M. X.; ZHANG, N. W.; LIU, H. F.; XU, M. G.; LIU, G. Y.; CHAI, C. Y. Immuno-voltammetric determination of chloramphenicol residues in milk. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. China, v. 35, p. 1731-1735, 2007.

SORENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H.; HANSEN, H. Determination of chloramphenicol in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. Denmark, v. 86, p. 703-706, 2003.

STOREY, J.; PFENNING, A.; TURNIPSEED, S.; NANDREA, G.; LEE, R.; BURNS, C.; MADSON, M. Determination of chloramphenicol residues in shrimp and crab tissues by electrospray triple quadrupole LC-MS/MS. **US FDA Laboratory Information Bulletin n° 4306**. Denver, v. 19, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 13 Out. 2007.

TENDENCIA, E. A. & PEÑA, L. D. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. **Aquaculture**. Philippines, v. 195, p. 193-204, 2001.

USDA. United States Department of Agriculture. **CAM Method 5.022-3**, 1991.

USDA. United States Department of Agriculture. **Methods of analysis for veterinary drug residues: validation guidelines**, 1998.

VASIL, M. Resistance to antibiotics in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cow mastitis, milk, udder smears, and milking installation. **Veterinarni Medicina**. Czech Republic, v. 44, p. 115-120, 1999.

WHO. World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. **WHO Food Additives Series n° 53**. Geneva, 2004. Disponível em: <<http://www.inchem.org>>. Acesso em: 30 Jul. 2008.

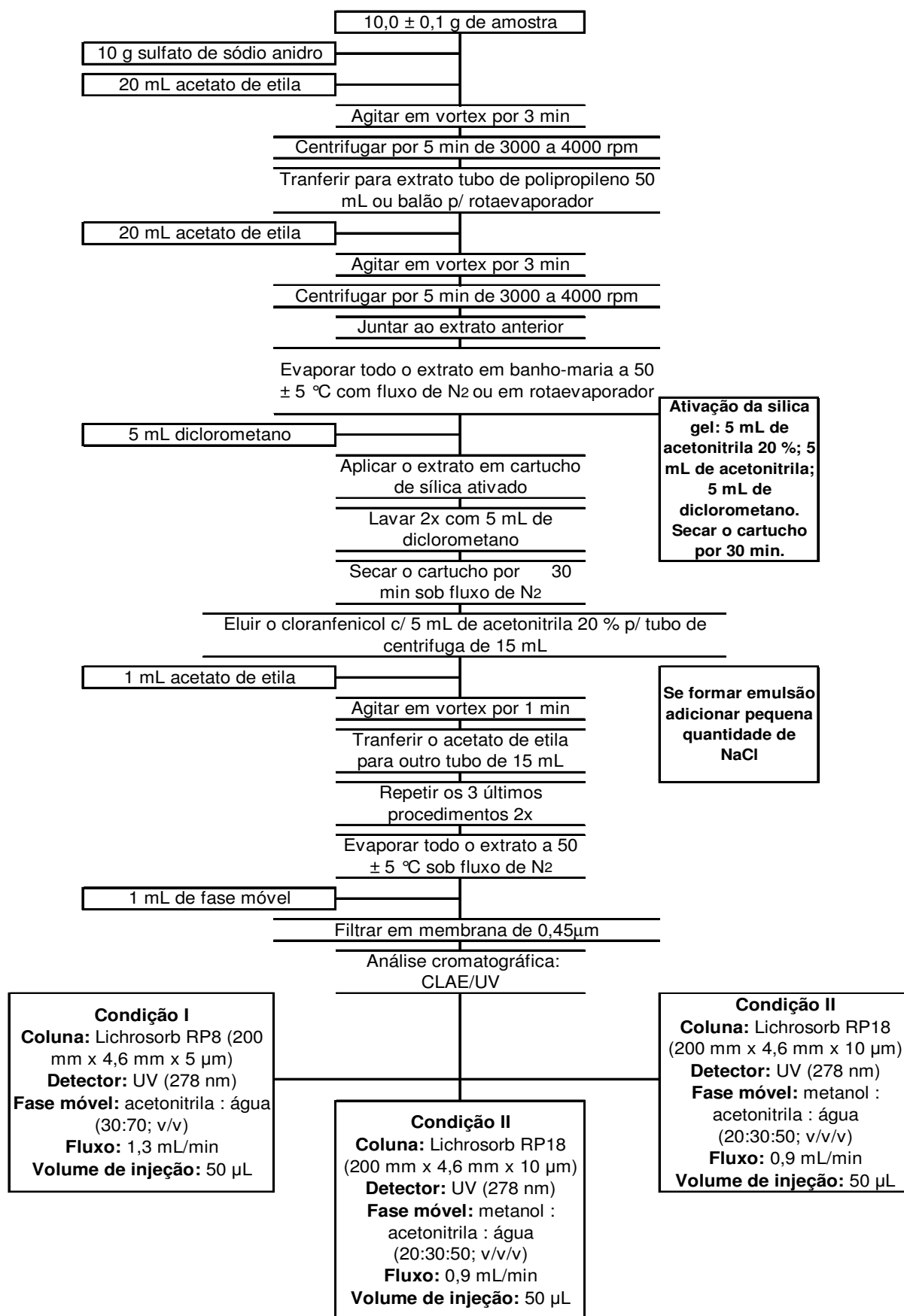
CONCLUSÕES GERAIS

O cloranfenicol é um composto com efeitos toxicológicos graves que restringem o seu uso tanto na terapêutica humana quanto para fins veterinários. Entretanto, seu uso indiscriminado resulta em resíduos em alimentos e favorece o surgimento de microorganismos resistentes, representando riscos para saúde humana. Portanto, é justificável monitorar a presença dos seus resíduos em alimentos. Assim, no Brasil foram criados programas nacionais como o PNCR pelo Ministério da Agricultura e o PAMVet pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA).

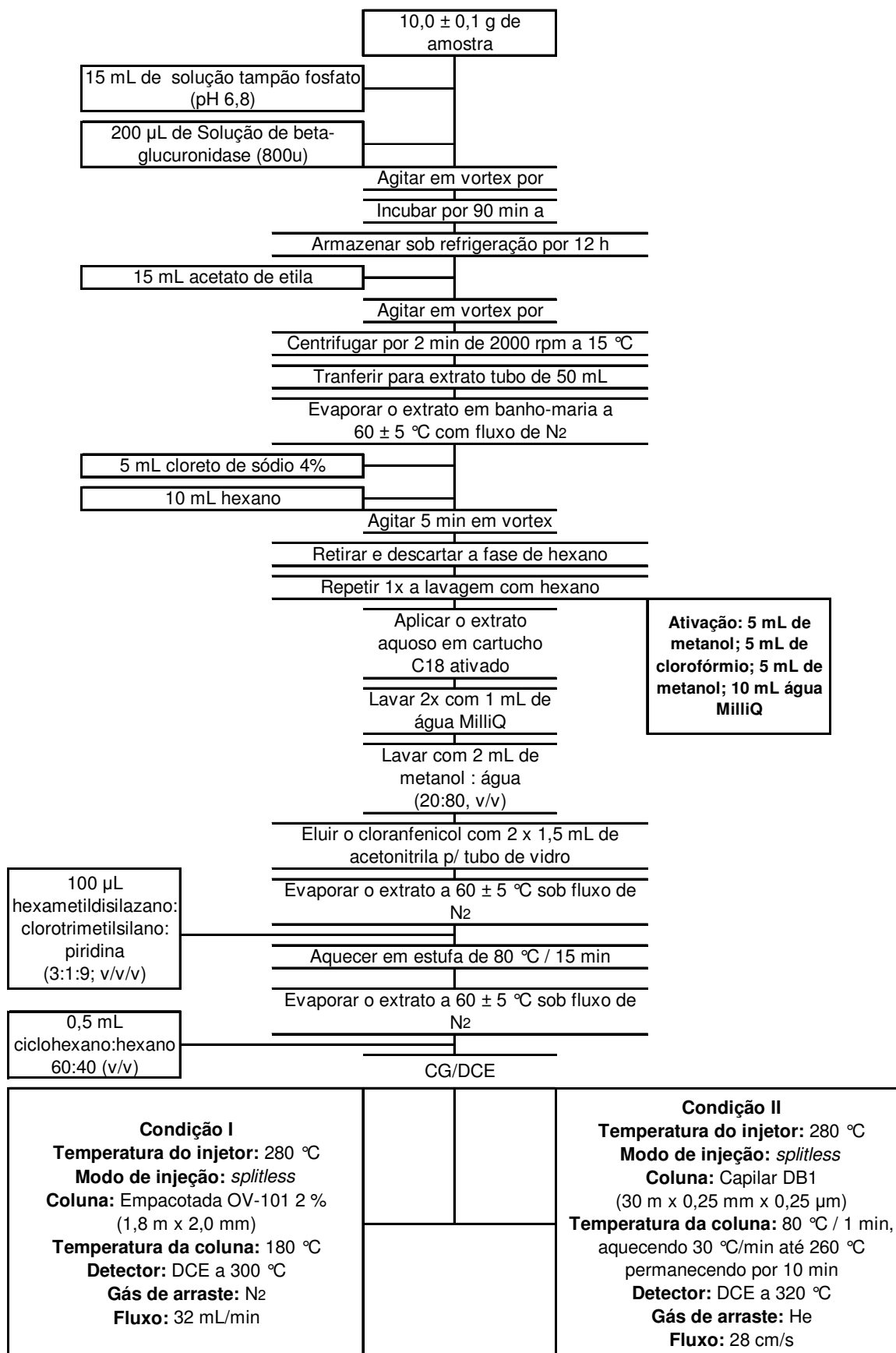
No presente estudo foi desenvolvido um método analítico para a determinação de resíduos de CAP para matrizes alimentares que não possuem métodos descritos na literatura (carnes caprinas e ovinas e leite caprino). O método desenvolvido utiliza extração do CAP com acetato de etila, remoção dos lipídeos do extrato por lavagens com hexano e purificação com SPE-C18. Para a identificação foram utilizadas as técnicas de CG/EM e CG/DCE, e para a quantificação o método da padronização externa por CG/DCE. O método foi validado para a matriz leite caprino sendo específico, linear ($R^2 = 0,998$), preciso (RSD < 15%), exato e robusto, apresentando elevada sensibilidade (LD 0,03 µg/L e LQ 0,10 µg/L). O método proposto funciona como uma alternativa para o monitoramento e/ou *screening* de resíduos de CAP para laboratórios, reduzindo os custos de investimentos para aquisição de equipamentos que utilizam técnicas de espectrometria de massas em *tandem*. Isto dá suporte à consolidação dos programas nacionais para análise e controle de resíduos de medicamentos veterinários. É indicada a realização de estudos de validação para as matrizes de carnes caprinas e ovinas.

ANEXOS

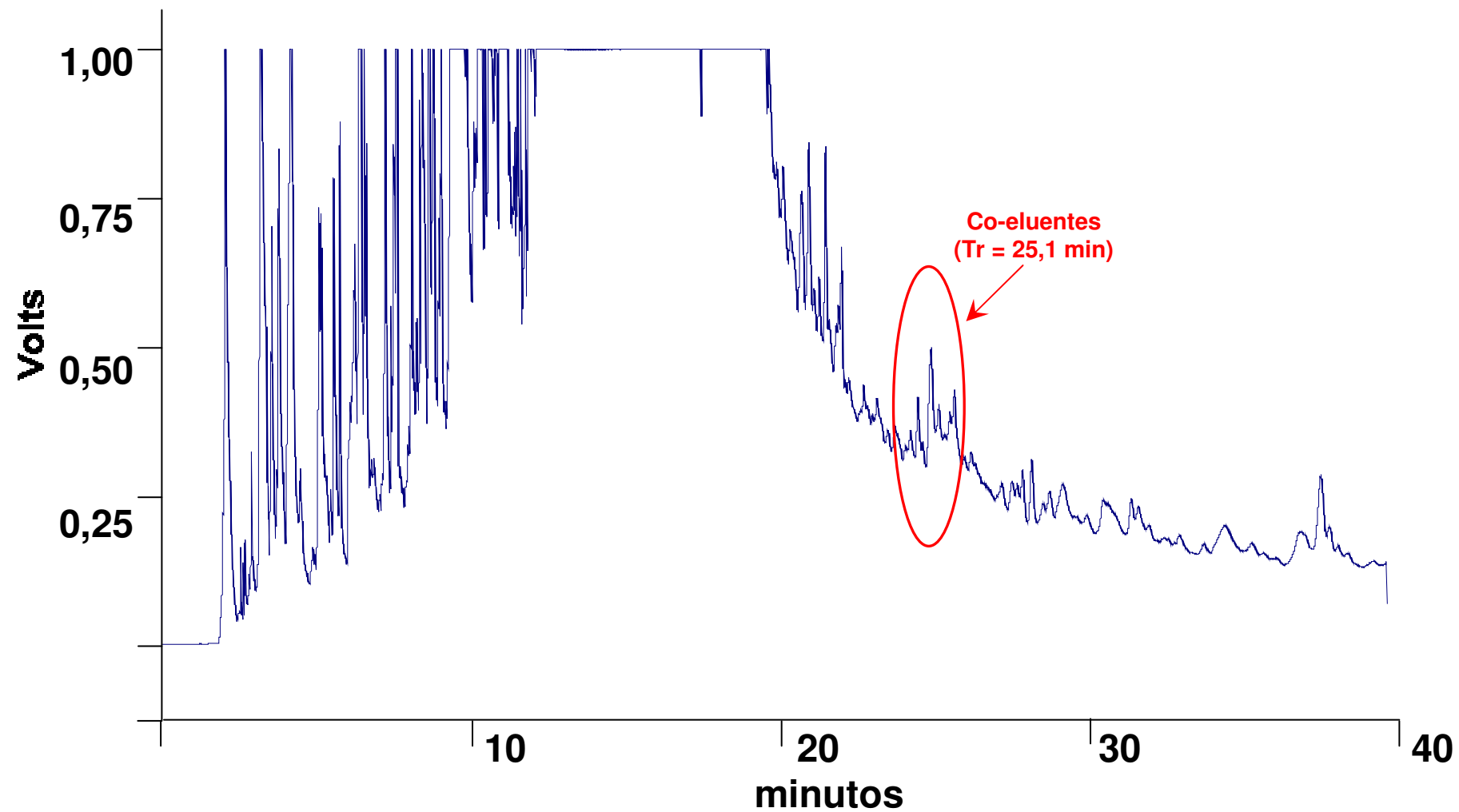
Anexo I. Fluxograma da metodologia oficial 203/01 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para análise de resíduos de CAP em músculo (aves, bovinos, eqüinos e suínos) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector Ultravioleta (CLAE/UV).



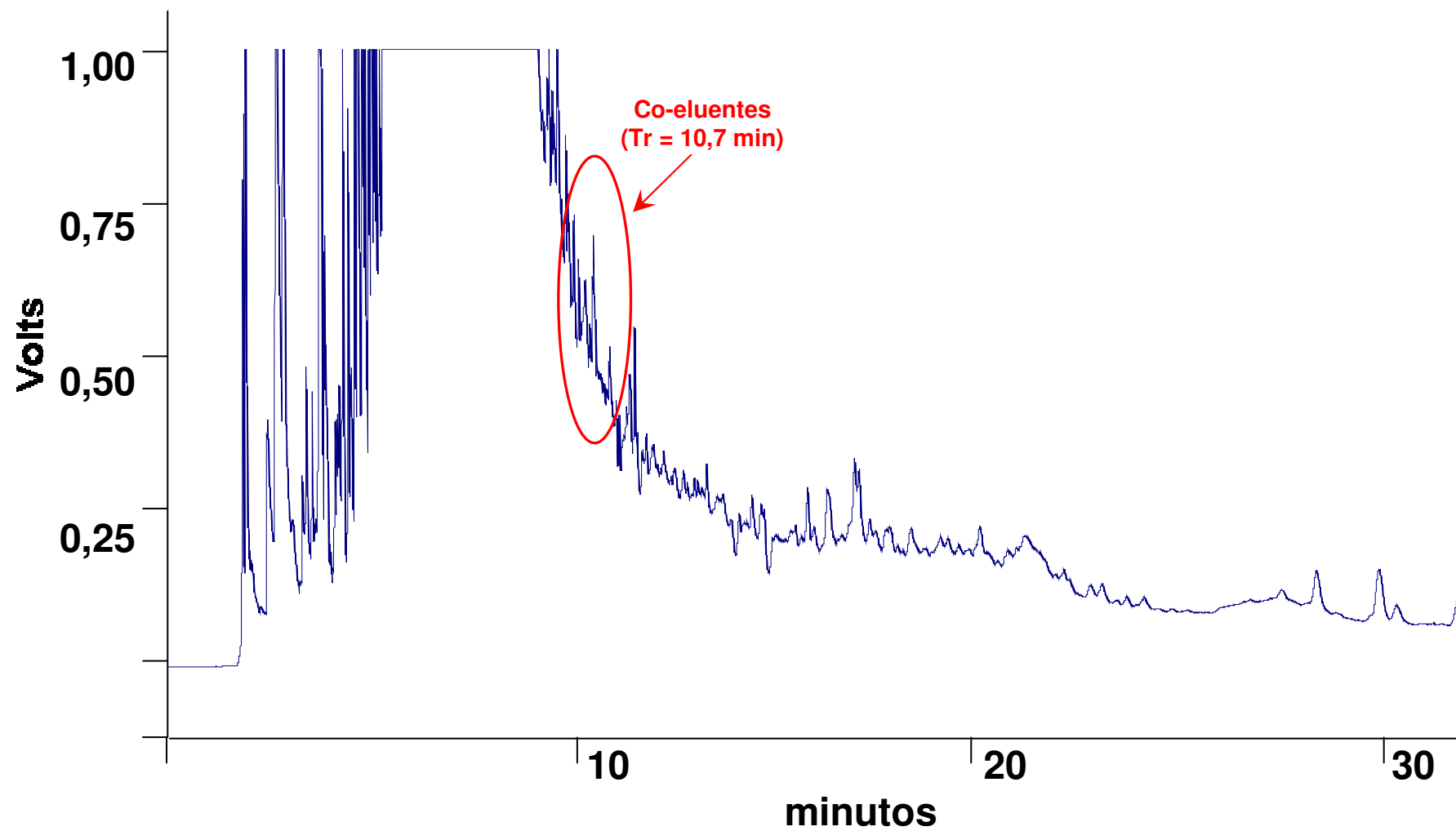
Anexo II. Fluxograma da metodologia oficial 203/03 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para análise de resíduos de CAP em músculo (aves, bovinos, eqüinos e suínos) por cromatografia gasosa com detector de captura eletrônica (CG/DCE).



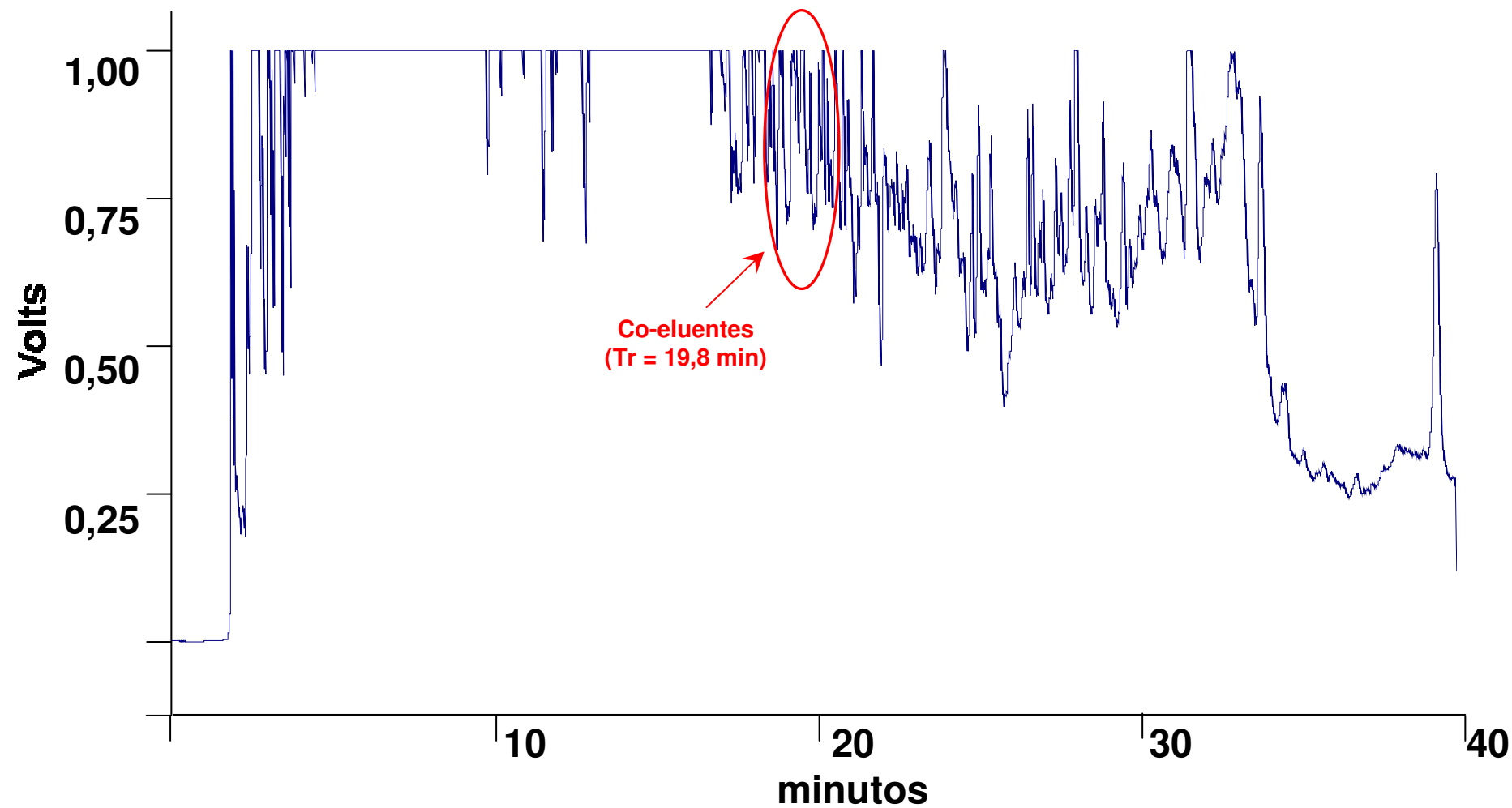
Anexo III – Cromatograma da matriz mel obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 80 $^{\circ}$ C / 1 min, 10 $^{\circ}$ C / min até 230 $^{\circ}$ C / 24 min. Tempo total de corrida: 40 min.



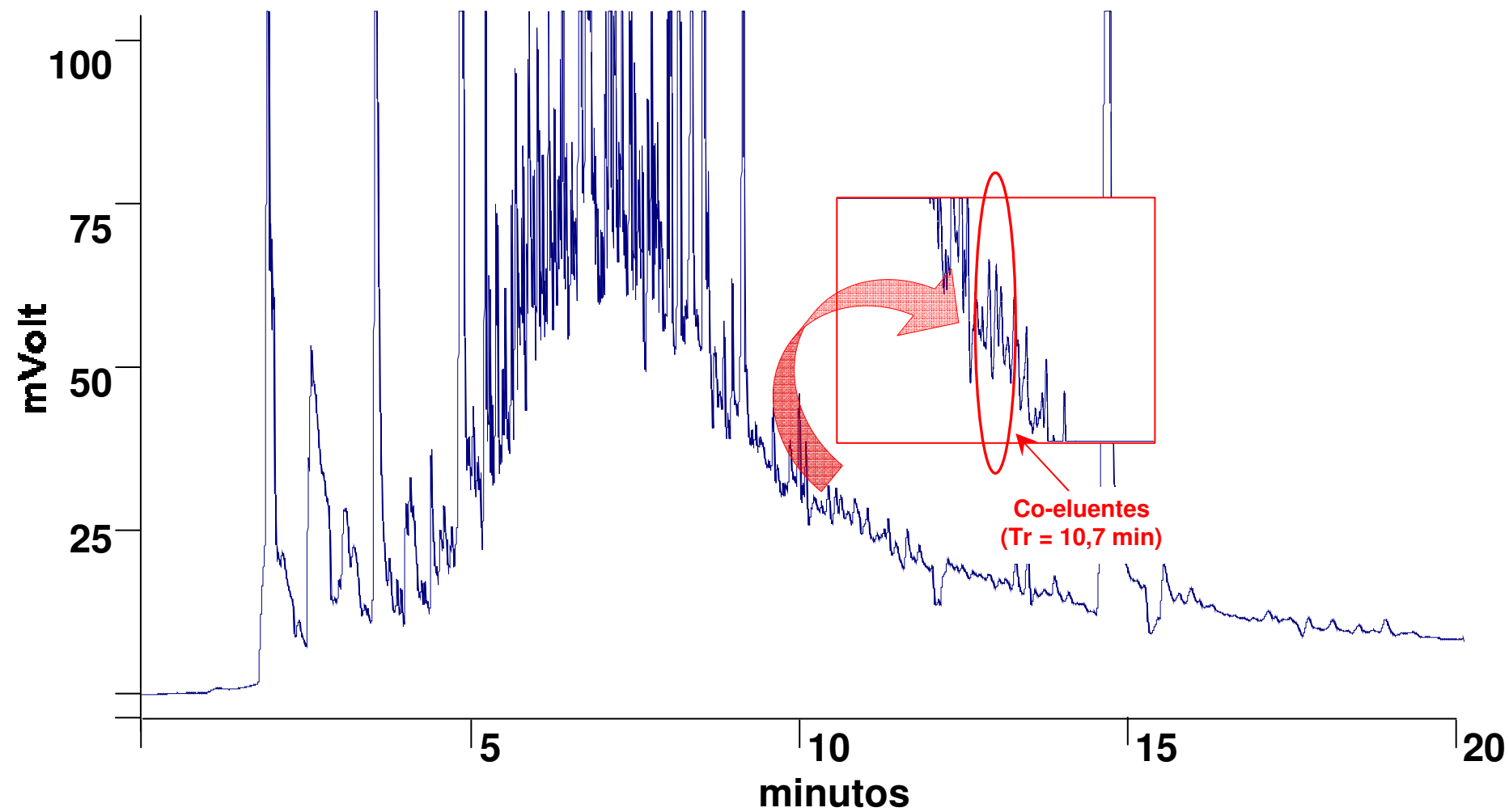
Anexo IV – Cromatograma da matriz mel obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 90 $^{\circ}$ C / 1 min, 30 $^{\circ}$ C / min até 260 $^{\circ}$ C / 26,33 min. Tempo total de corrida: 33 min.



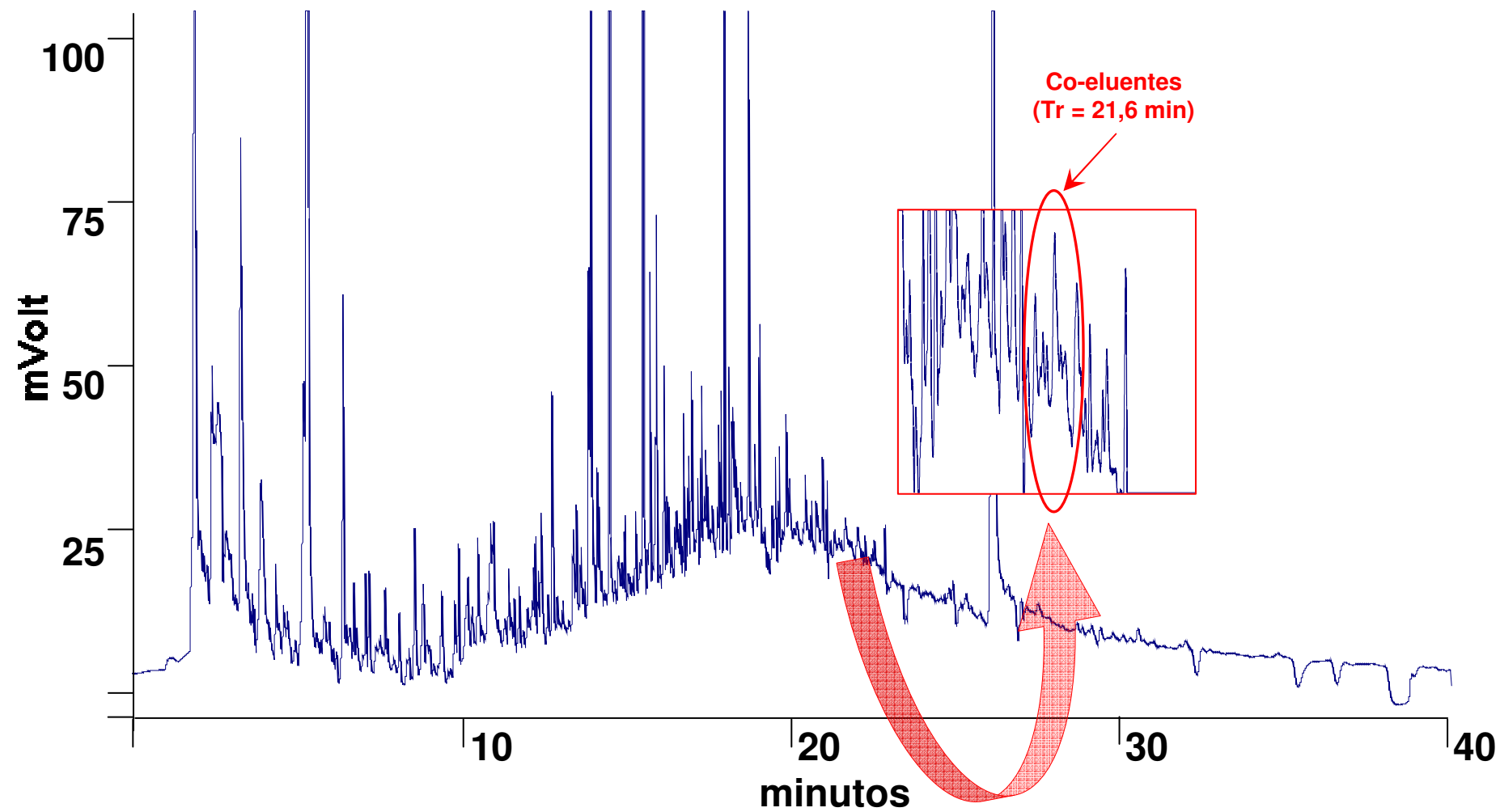
Anexo V – Cromatograma da matriz mel obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 90 $^{\circ}$ C / 1 min, 60 $^{\circ}$ C / min até 200 $^{\circ}$ C / 7 min. 5 $^{\circ}$ C / min até 260 $^{\circ}$ C / 18.16 min. Tempo total de corrida: 40 min.



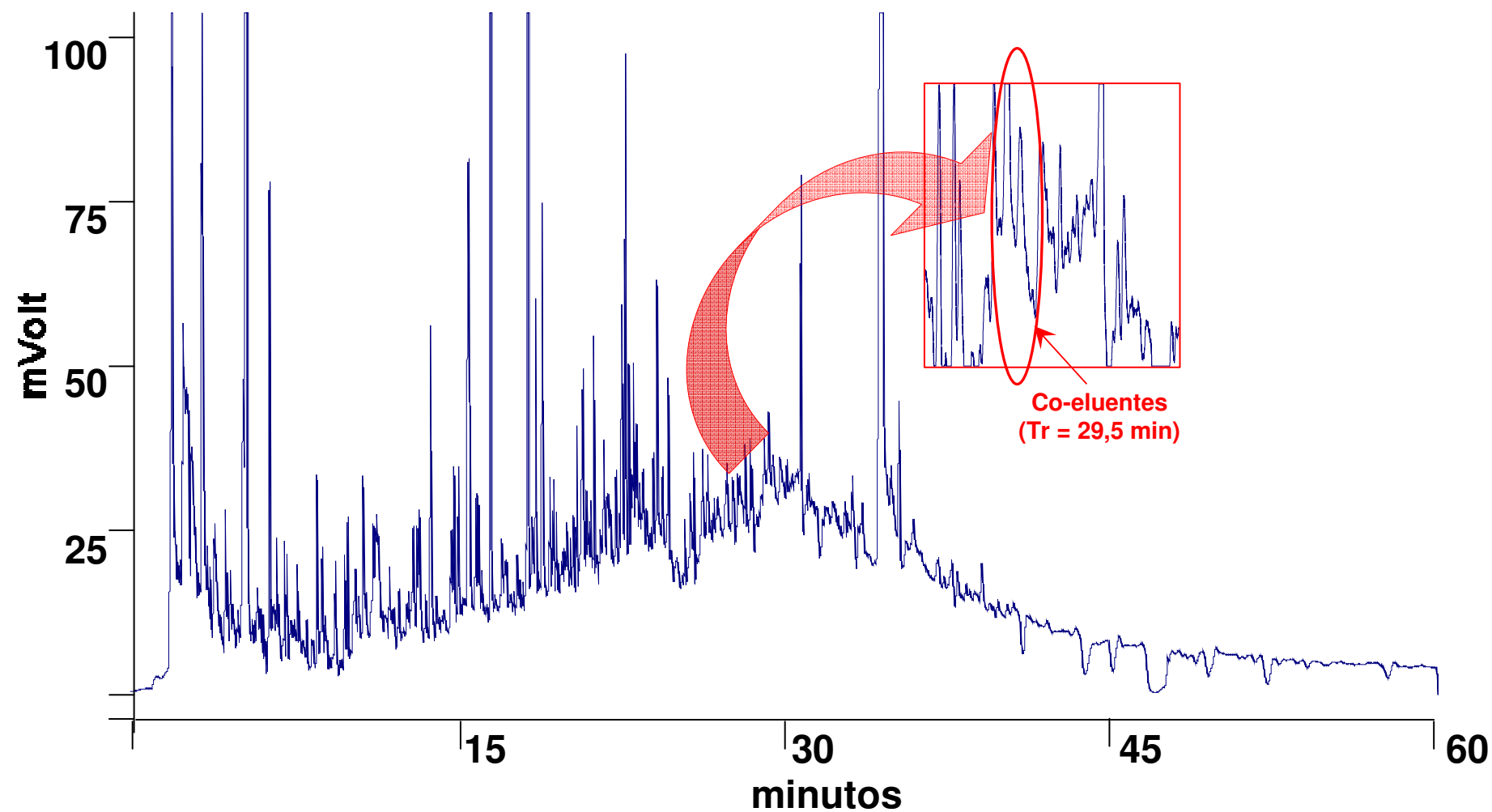
Anexo VI – Cromatograma da matriz camarão obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 90 °C / 1 min, 30 °C / min até 260 °C / 13,33 min. Tempo total de corrida: 20 min.



Anexo VII – Cromatograma da matriz camarão obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 90 $^{\circ}$ C / 1 min, 60 $^{\circ}$ C / min até 150 $^{\circ}$ C / 7 min, 10 $^{\circ}$ C / min até 260 $^{\circ}$ C / 20 min. Tempo total de corrida: 40 min.



Anexo VIII – Cromatograma da matriz camarão obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 90 $^{\circ}$ C / 1 min, 60 $^{\circ}$ C / min até 150 $^{\circ}$ C / 7 min, 5 $^{\circ}$ C / min até 260 $^{\circ}$ C / 29 min. Tempo total de corrida: 60 min.



Anexo IX – Cromatograma da matriz camarão obtido nas seguintes condições de temperatura da coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): temperatura inicial 90 $^{\circ}$ C / 1 min, 60 $^{\circ}$ C / min até 200 $^{\circ}$ C / 7 min, 5 $^{\circ}$ C / min até 260 $^{\circ}$ C / 18 min. Tempo total de corrida: 40 min.

