

## DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE CLORANFENICOL EM AMOSTRAS DE LEITE E MEL INDUSTRIALIZADOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM “TANDEM” (CLAE-EM/EM)

**Helio Alves Martins Júnior\*, Oscar Vega Bustillos e Maria Aparecida Faustino Pires**

Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

**Daniel Temponi Lebre e Alexandre Yautin Wang**

Applied Biosystems do Brasil Ltda., Av. do Café, 277 - 1º andar - Torre B, 04311-000 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 10/3/05; aceito em 15/8/05; publicado na web em 16/2/06

DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN INDUSTRIALIZED MILK AND HONEY SAMPLES USING LC-MS/MS. The present work shows a method for the determination of chloramphenicol (CAP) antibiotic in milk, powder milk and honey. The solid phase extraction and liquid-liquid extraction were applied as a clean-up and pre-concentration strategies followed by LC-ESI/MS/MS analysis. The recovery was studied for different fortification levels from 0.05 to 1.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  in milk, showing values between 91 – 101% and RSD below 8.0%, while honey was spiked with a concentration of 0.20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  yielding a mean recovery of 83% and RSD of 6.5%. The quantification transition 321>152 showed a LOD of 0.52  $\text{ng kg}^{-1}$  and LOQ of 1.85  $\text{ng kg}^{-1}$ .

Keywords: chloramphenicol; milk; honey.

### INTRODUÇÃO

O composto cloranfenicol (CAP), D-(-)-treo-2,2-dicloro-N-[ $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -(hidroximetil)-p-nitrofenil], de massa molar 323.1325  $\text{g mol}^{-1}$  e fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$  é um antibiótico com classificação bacteriostática de amplo espectro, que tem sido aplicado como medicamento de uso veterinário e humano, devido a suas propriedades de combater uma variedade de microorganismos aeróbios e anaeróbios. O CAP é um composto lipossolúvel que se difunde através da membrana celular e se liga de forma reversível à subunidade protéica 50S dos ribossomos das células de procariontes, evitando a transferência de aminoácidos das cadeias peptídicas em formação, inibindo assim a síntese da proteína.

Em humanos, o CAP tem seu uso limitado ao tratamento de conjuntivite aguda, meningite bacteriana e febre tifóide, nas quais os demais antibióticos são mais tóxicos e menos eficazes. No entanto, a administração independente da dose está relacionada a efeitos colaterais perigosos, como anemia plasmática (diminuição dos glóbulos vermelhos por toxicidade aguda da medula óssea)<sup>1</sup>. Por esta razão, a Comunidade Européia proibiu, em 1994, a administração do CAP em animais, como bovinos, suínos, camaráos, abelhas, etc<sup>2</sup>.

Em 1996, a Comunidade Européia, através da Diretiva 96/23/EC, incluiu o CAP como substância de tolerância zero como limite residual em tecido animal<sup>3</sup>. Com o controle, em dezembro de 1997, a Comunidade Européia iniciou um programa de verificação de medicamentos veterinários de todos os produtos de origem animal importados de países em desenvolvimento, principalmente provenientes da Ásia<sup>4</sup>. Mais tarde, nos anos de 2001 e 2002, a Comunidade Européia detectou a presença destes medicamentos, principalmente CAP, em camarão, produtos da pisci-

cultura e mel, acarretando na proibição e comercialização dos mesmos nesses países<sup>5-7</sup>.

No Brasil, como em outros países, os antibióticos podem ser utilizados na agropecuária para combater doenças como mastite e metrite no período de lactação do gado<sup>8</sup>. Estes compostos têm sido utilizados no mel por aumentarem a produtividade a baixo custo. O emprego e uso indiscriminado de antibióticos e outras substâncias de uso veterinário podem estar associados com a contaminação de leite e produtos derivados, onde os resíduos das mesmas podem ser encontrados acima dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos. Atualmente, o Brasil vem ocupando posição de destaque na exportação de “commodities”, por isso a preocupação com a qualidade dos mesmos é de extrema importância para competição no mercado globalizado e segurança do consumidor. Em virtude disto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou em novembro de 2003, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo Humano (PAMVet), que compreendeu no primeiro ano de implementação a determinação do composto cloranfenicol entre outros antibacterianos e antiparasitários em 300 amostras de leite, na qual o LMR estabelecido para CAP é zero. O PAMVet prevê, para seu quinto ano de execução, a determinação de antibióticos em mel<sup>9</sup>.

Em concordância com a tolerância zero para CAP, a Comissão de Decisão 2003/181/EC da Comunidade Européia estabeleceu que o limite de quantificação requerido para um método analítico seja de 0,30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para substâncias que estão proibidas ou não autorizadas ao uso em leite, mel, carne, urina, ovos e produtos de piscicultura<sup>10</sup>.

Em geral, as técnicas mais utilizadas para determinação de CAP e outros medicamentos veterinários em alimentos são cromatografia em camada delgada (CCD)<sup>11,12</sup>, cromatografia gasosa com detectores de captura eletrônica (CG-DCE)<sup>13-16</sup> e espectrometria de massas (CG-EM)<sup>17-19</sup>, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV)<sup>19,20</sup>, espectrometria de massas (CLAE-

\*e-mail: helioup@usp.br

EM)<sup>21-24</sup> e espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM)<sup>18,25-31</sup>. Mais recentemente tem sido empregado o método de varredura e confirmação por ressonância de superfície por plasma (“surface plasmon resonance”), que utiliza biossensores específicos, providos com uma camada de cloranfenicol derivativo e um anticorpo que possui alta reatividade com o metabólito cloranfenicol glucoronídeo. Este último método, tem sido comparado com CLAE-EM/EM ou empregado em conjunto<sup>32,33</sup>.

A técnica de CLAE-EM/EM vem se destacando devido à sua alta especificidade analítica quando utilizada em modo “Multiple Reaction Monitoring” (MRM), no qual os analisadores de massas Q1 e Q3, selecionam os íons precursor e produto, respectivamente, definindo uma transição de  $m/z$  específica. Neste modo, o segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados de acordo com as razões  $m/z$  em Q1, são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisões com um gás inerte sob uma energia específica. Otimizando o detector para tal experimento (MRM), contendo mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gera-se um método confirmatório. Assim sendo, o emprego desta técnica fornece informações referentes à retenção do composto na coluna, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade, de acordo com os LRM estabelecidos (0,30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

A proposta deste trabalho é a divulgação da técnica de CLAE-EM/EM como uma excelente alternativa para análise de baixos níveis de CAP em matrizes de alimentos, como também, a aplicação desta tecnologia para avaliação de algumas amostras comerciais de leite e mel do mercado nacional, visto que as principais figuras de mérito desta técnica são alta detectabilidade, seletividade e geração de resultados auto-confirmatórios. O método emprega extração em fase sólida (EFS) em estireno-divinilbenzeno para pré-concentração e purificação das amostras de leite<sup>16,19,25,31,33-36</sup> e extração líquido-líquido, com utilização mínima de solvente orgânico, para amostras de mel<sup>28,29,32,33</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau HPLC ou analítico e as amostras foram processadas em tubos de polipropileno de 15,0 mL (Greiner, Alemanha). A quantidade de 1,0 g de padrão primário do composto cloranfenicol com 98% de pureza foi adquirida da empresa Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Água purificada foi obtida em um sistema EASYpure RF System (Barnstead, Dubuque, IA, EUA). Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila (Fluka, Bucks, SW), clorofórmio P.A. (Merck, Darmstadt, AL), metanol e acetato de etila (J. T. Baker, Deventer, HO). Acetato de amônio P.A. (Merck, Darmstadt, AL) foi utilizado como aditivo de fase móvel e hidrogenofosfato dissódico P.A. (Merck, Darmstadt, AL) foi empregado nos procedimentos de extração em fase sólida (EFS) em colunas Supelclean™ ENVI™ Chrom P (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) de 3,0 mL (250 mg), empacotadas com copolímero estireno divinilbenzeno.

### Preparo das soluções

Solução estoque de CAP foi preparada em  $\text{CH}_3\text{CN}$  na concentração de 220  $\text{mg L}^{-1}$ . As soluções usadas para construção da curva analítica foram obtidas em concentrações entre 0,025 a 2,500  $\text{ng mL}^{-1}$  em  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (50%, v/v), após diluições adequadas de uma solução intermediária de 100  $\text{ng mL}^{-1}$  preparada em  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$

(50%, v/v). A caracterização do CAP e a otimização do espectrômetro de massas foram realizadas através da infusão de solução padrão de 100  $\text{ng mL}^{-1}$ , preparada em  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (50%, v/v), com 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de acetato de amônio. A solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em concentração de 0,50  $\text{mol L}^{-1}$  e pH 6 foi preparada em água purificada, pela dissolução de 17,9070 g do sal em 50,0 mL de solução.

### Fortificação das amostras

As amostras de leite e mel, isentas do composto CAP e adquiridas em estabelecimentos comerciais, foram fortificadas em concentrações conhecidas do analito para estudo de exatidão e precisão do método. As fortificações foram realizadas com adição de volumes adequados de uma solução em concentração de 10,000  $\text{ng mL}^{-1}$ , preparada em  $\text{H}_2\text{O}$ . As amostras de leite foram fortificadas nas seguintes concentrações: 0,050; 0,100 e 1,000  $\text{ng mL}^{-1}$  e as amostras de mel foram fortificadas na concentração de 0,200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### Método de extração

#### Amostras de leite

O método analítico descrito neste trabalho foi desenvolvido por Hormazabal e colaboradores<sup>35</sup> e Oresnik e colaboradores<sup>36</sup> e foi empregado com pequenas modificações descritas abaixo.

Inicialmente, 2,0 mL de amostra foram transferidos para um frasco de 15,0 mL de capacidade. Adicionou-se 5,0 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  seguido de agitação em vortex por 1 min. Após a agitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 min e a fase orgânica foi transferida para outro frasco de 15,0 mL de capacidade. Adicionaram-se 5,0 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitando-se novamente a amostra em vortex durante 1 min e centrifugando-se a 3000 rpm durante 5 min. Descartou-se a fase aquosa superior e a fase orgânica foi seca em fluxo de  $\text{N}_2$ . Os resíduos foram dissolvidos em 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{OH}$  seguidos da adição de 3,0 mL de água e 0,5 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,50  $\text{mol L}^{-1}$  (Figura 1).

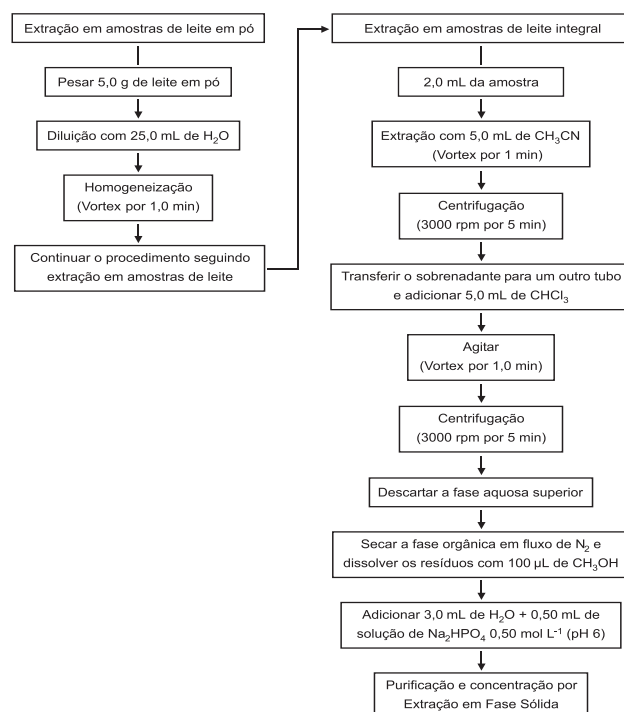


Figura 1. Procedimento de extração líquido-líquido para as amostras de leite

### Purificação das amostras de leite (EFS)

Condiçãoou-se a coluna de EFS com 3,0 mL de H<sub>2</sub>O seguidos de 3,0 mL de CH<sub>3</sub>OH e 3,0 mL de H<sub>2</sub>O novamente. Em seguida, adicionou-se e eluiu-se a amostra na coluna. Para a eliminação dos interferentes, eluiu-se na coluna de EFS duas medidas de 3,0 mL de H<sub>2</sub>O e uma medida de 1,0 mL de solução CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (50%, v/v). Secou-se a coluna e elui-se o CAP com dois volumes de 1,0 mL de CH<sub>3</sub>OH. Após eluição, secou-se o eluato em fluxo de N<sub>2</sub> e dissolveu-se os resíduos em 1,0 mL de solução CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (50%, v/v) para posterior injeção de 20 µL da amostra no sistema CLAE-EM/EM.

### Amostras de mel

As amostras de mel foram preparadas por dissolução de 1,0 g de amostra em 1,0 mL de água, seguida de extração com 4,0 mL de acetato de etila sob agitação em vortex por 1 min. Uma alíquota de 1,0 mL do extrato orgânico foi seca sob fluxo de N<sub>2</sub> e os resíduos foram dissolvidos com 1,0 mL de CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (50%, v/v) para injeção (Figura 2).

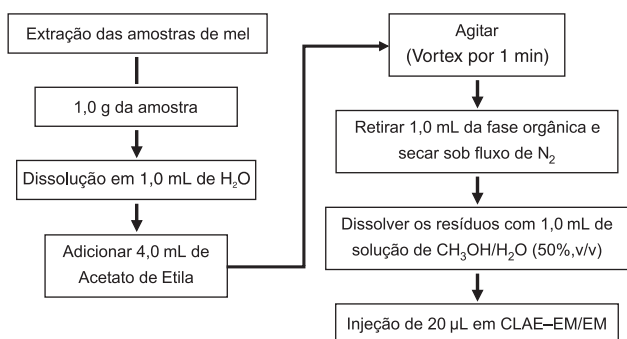


Figura 2. Esquema de extração de CAP em amostras de mel

### Equipamentos

As análises foram realizadas em sistema de CLAE-EM/EM empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência, Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL), equipado com bomba quaternária e amostrador automático com capacidade para 100 frascos de injeção, acoplado a espectrômetro de massas triploquadropolar API 4000<sup>TM</sup>, Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Toronto, CA), com fonte de ionização Turbo V<sup>TM</sup> operado no modo de ionização TurboIonSpray<sup>®</sup> (“electrospray” - ESI) e equipado com bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). A

aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o software Analyst<sup>®</sup> versão 1.4.1.

### Condições de análise do sistema CLAE-EM/EM

#### Cromatografia líquida de alta eficiência

A eluição cromatográfica foi realizada em coluna Inertsil ODS-3 de 3,0 µm, 50,0 x 2,1 mm d.i. (Metachem, CA, EUA), sob temperatura de 25 °C, empregando o seguinte gradiente de eluição: inicialmente com 50% (v/v) das fases A (solução aquosa contendo 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO) e B (solução 95/5 de CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O v/v contendo 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO), com rampa linear para 90% da fase B em 5 min e permanecendo nesta composição por mais 5 min, totalizando o tempo de análise de 10 min. O tempo de equilíbrio da coluna foi de 4,5 min. O fluxo de fase móvel foi mantido a 300 µL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 20 µL.

#### Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas foi operado em modo MRM com ionização por “electrospray”, no modo de íons negativos à 600 °C. A voltagem do capilar foi otimizada à -4500 V, com um potencial de orifício (“Declustering Potential” – DP) de -60 V. Nitrogênio foi usado como gás de colisão (“CAD Gas”) e gás de dessolvatação (“Curtain Gas<sup>TM</sup>”) às pressões respectivas de 8,0 e 20,0 psi. Ar sintético ultrapuro foi empregado como gás nebulizante (“GS1”) e como gás secante aquecido (“GS2”) às pressões respectivas de 35,0 e 40,0 psi. A Figura 3 ilustra o sistema de ESI/EM/EM, os parâmetros de ionização e detecção.

Os fragmentos selecionados para determinação em modo MRM para o íon precursor [M – H]<sup>-</sup> de *m/z* 321 foram *m/z* 152, 176, 194 e 257. A Tabela 1 apresenta os parâmetros de DP (Potencial de Orifício), CE (Energia de Colisão) e CXP (Potencial de Saída da Cella de Colisão) otimizados para cada transição de *m/z* monitorada.

Tabela 1. Parâmetros otimizados do Potencial do Orifício (DP), Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Cella de Colisão (CXP), para as transições monitoradas em modo MRM

Íon Precursor ( <i>m/z</i> )	Íon Produto ( <i>m/z</i> )	DP(V)	CE(eV)	CXP(V)
321,1	152,1	-60	-22	-15
321,1	176,0	-60	-20	-11
321,1	194,0	-60	-16	-13
321,1	257,0	-60	-18	-19

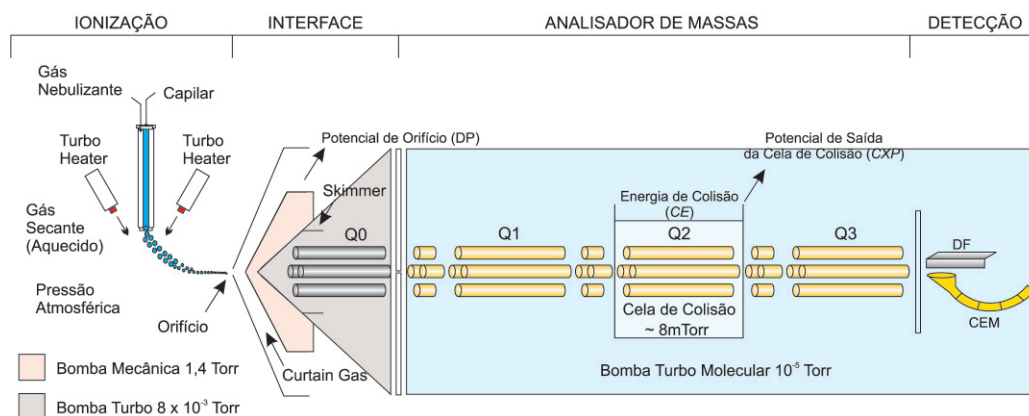


Figura 3. Esquema do sistema de espectrometria de massas triploquadropolo API 4000<sup>TM</sup> equipado com fonte de “electrospray” (ESI/EM/EM)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas foi otimizado em modo MRM, através da infusão de uma solução de 100,0 ng mL<sup>-1</sup> de CAP em CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (50%, 0v/v) com 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO sob um fluxo de 10 μL min<sup>-1</sup>. A análise quantitativa do CAP foi realizada no modo MRM através do monitoramento de quatro transições de *m/z* para o íon precursor [M – H]<sup>-</sup>, após a otimização, proporcionando assim a confirmação dos resultados<sup>37</sup>. A infusão do composto no sistema ESI/EM/EM permitiu sua caracterização nos modos EM (“Q1 Scan”) e EM/EM (“Product Ion Scan” e “Precursor Ion Scan”), cujas informações são referentes à ionização do composto (identificação do íon precursor) e ao padrão de fragmentação estrutural, respectivamente. As Figuras 4 e 5 apresentam os espectros de massas do CAP obtidos nos modos “Q1 Scan” e “Product Ion Scan”, respectivamente, em ionização por “electrospray” no modo de íons negativos. Os íons produto de interesse foram confirmados através do modo “Precursor Ion Scan”, como mostrado nos espectros de massas da Figura 6.

No espectro de massas do modo EM (“Q1 Scan”), um pico de *m/z* 321, correspondente à molécula desprotonada do CAP, [M – H]<sup>-</sup>, apresentou alta detectabilidade no modo de íons negativos. Neste espectro é observada a distribuição isotopomérica característica do

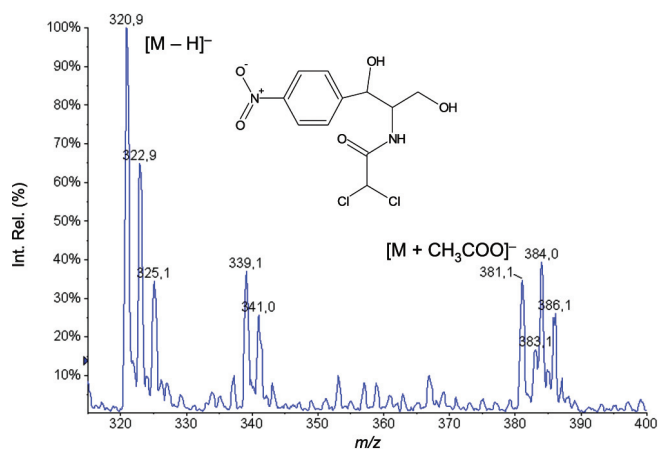


Figura 4. Espectro de massas de CAP obtido em modo EM (“Q1 Scan”)

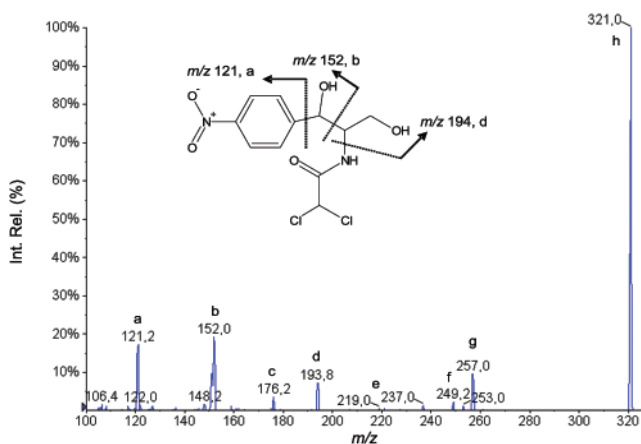


Figura 5. Espectro de massas de CAP obtido em modo EM/EM (“Product Ion Scan”), onde, c = [d – H<sub>2</sub>O], e = [321 – (HCOCl<sub>2</sub>) – 2H], f = [321 – HCl<sub>2</sub>], g = [321 – HCOCl] e h = *m/z* 321

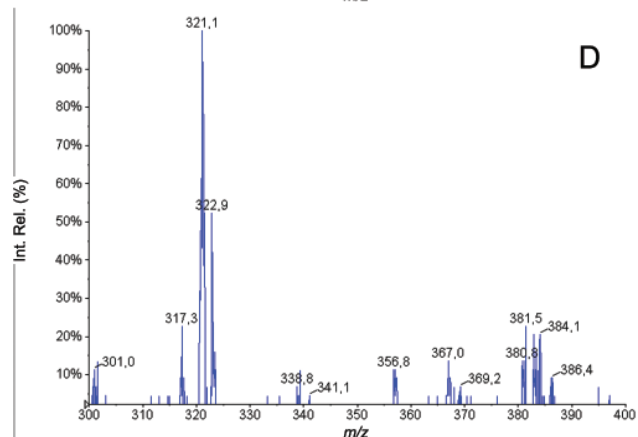
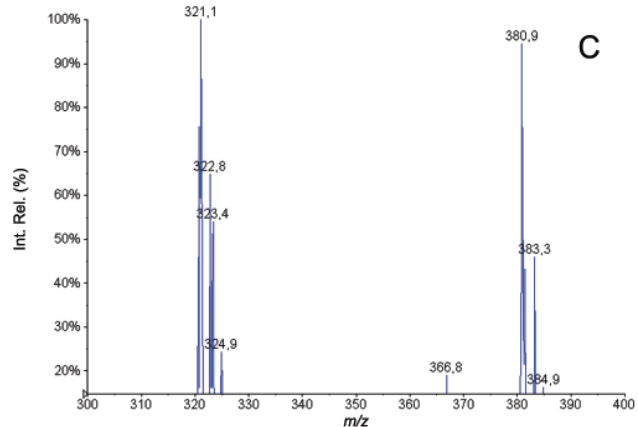
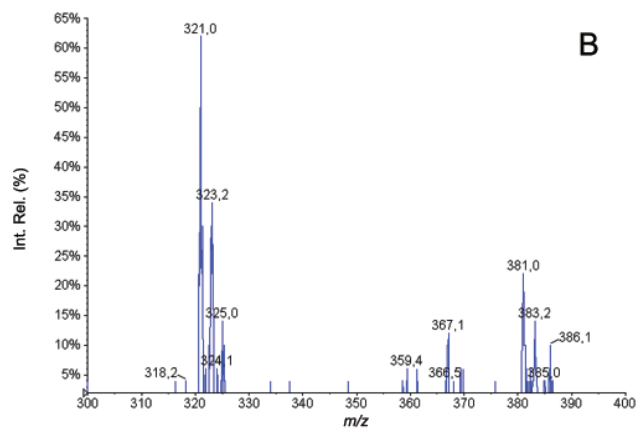
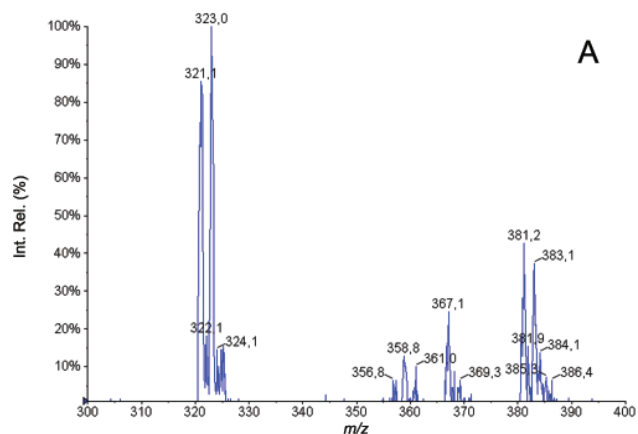


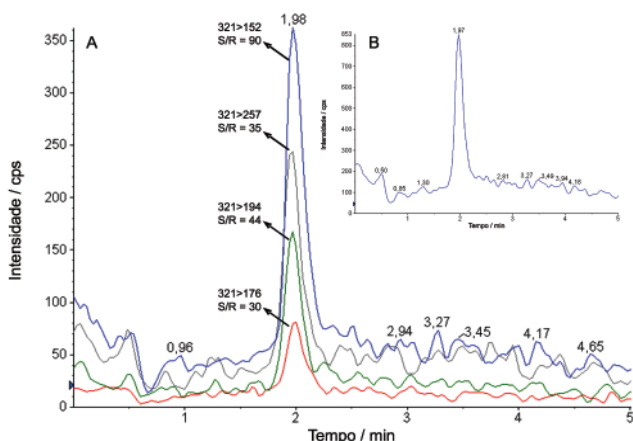
Figura 6. Espectros de massas de CAP obtidos em modo EM/EM (“Precursor Ion Scan”), onde, A = Precursor de *m/z* 156, B = Precursor de *m/z* 176, C = Precursor de *m/z* 194 e D = Precursor de *m/z* 257

CAP desprotonado e de um cluster de íons adutos de acetato  $[M + CH_3COO]^-$ , formados no processo de ionização por “electrospray”. Em trabalho recente de Guy e colaboradores<sup>31</sup>, diferentes transições de  $m/z$  foram monitoradas em MRM para os íons precursores de  $m/z$  321 e 323 e seus íons produto, com objetivo de quantificação e confirmação do CAP, respectivamente.

O espectro de massas obtido em modo EM/EM (“Product Ion Scan”) apresenta pelo menos cinco fragmentos característicos do CAP  $m/z$  121, 152, 176, 194 e 257, dispostos na seguinte abundância relativa observada de 87:100:17:37:50, respectivamente. Entre os fragmentos do CAP  $[M - H]^-$ , foram escolhidos quatro íons produto de  $m/z$  152, 176, 194 e 257, dentre os quais a transição mais sensível de  $m/z$  321>152 para quantificação e as demais transições como proposta de confirmação. O monitoramento de quatro transições confere ao método analítico um número de pontos de identificação superior ao recomendado pela Comunidade Européia (“Commission Decision 2002/657/EC”) que é de quatro pontos, correspondente à seleção de um íon precursor e dois íons produto (duas transições de  $m/z$ ), além do tempo de retenção na coluna, para substâncias com tolerância zero<sup>37</sup>.

### Curva analítica

Após a otimização do modo MRM via infusão foram estabelecidas as condições de ionização sob fluxo de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ , seguidas das condições de eluição do composto em coluna de fase reversa, conforme descrito na parte experimental. A Figura 7 mostra um cromatograma da amostra padrão em concentração de 0,025  $\text{ng mL}^{-1}$  (0,50  $\mu\text{g}$  injetado na coluna cromatográfica), nas condições de separação e detecção estabelecidas. Nesta Figura, observa-se a detecção de todas as transições, assim como a seletividade e sensibilidade da técnica, através da relação sinal/ruído (S/R) calculada.



**Figura 7.** Cromatograma de padrão de CAP de 0,025  $\text{ng mL}^{-1}$  (0,50  $\mu\text{g}$  injetado na coluna cromatográfica), onde, A = Cromatograma (“Extract Ion Chromatogram” – XIC) e B = Cromatograma (“Total Ion Chromatogram” – TIC)

Para quantificação do composto CAP, tanto nos estudos de recuperação quanto para as amostras comerciais, foi construída uma curva analítica com sete níveis de concentração: 0,025; 0,050; 0,100; 0,500; 1,000; 1,500 e 2,000  $\text{ng mL}^{-1}$  em solução de  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (50%, v/v), na qual cada ponto foi injetado em cinco replicatas ( $n = 5$ ). A Tabela 2 apresenta os coeficientes de correlação ( $r^2$ ), inclinação da reta (a) e intersecção (b), obtidos através da regressão linear das curvas analíticas para cada transição monitorada em modo MRM. O desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e exatidão (%) atribuídos às injeções repetitivas das soluções padrão,

monitorados na transição de quantificação,  $m/z$  321>152, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2.** Valores da equação da reta obtidos através da regressão linear

Transição( $m/z$ )	a	b	$r^2$
321>152	$1,53 \times 10^5$	- 713	0,9987
321>176	$3,44 \times 10^4$	-179	0,9984
321>194	$5,76 \times 10^4$	-28,7	0,9990
321>257	$8,97 \times 10^4$	-124	0,9989

**Tabela 3.** Resultados de precisão e exatidão da técnica, monitoradas para transição de quantificação ( $m/z$  321>152), realizada através de repetitivas injeções das soluções padrão

Concentração ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Concentração Média ( $n = 5$ )	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
0,025	0,024	0,002	9,21	94,2
0,050	0,052	0,003	6,11	104
0,100	0,101	0,002	1,81	101
0,500	0,512	0,013	2,54	102
1,000	0,997	0,031	3,07	99,6
1,500	1,45	0,111	7,66	96,6
2,500	2,54	0,083	3,26	102

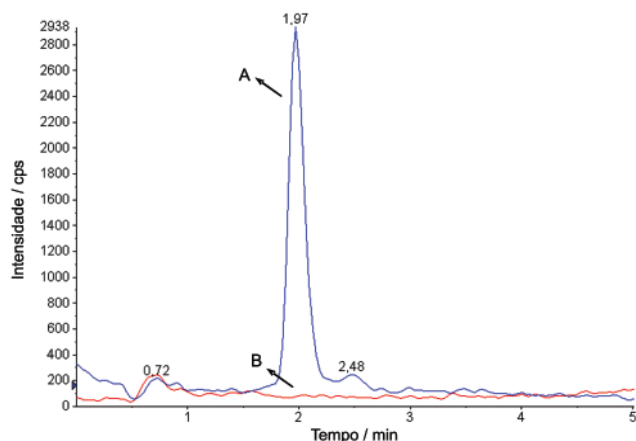
### Estudo de recuperação

A recuperação do método foi estudada em três níveis de fortificação para amostras de leite, 0,050; 0,100; e 1,000  $\text{ng mL}^{-1}$  ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), obtendo-se valores entre 91 e 101%, com desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 10% ( $n = 6$ ). Para as amostras de mel, estudos de recuperação foram conduzidos na concentração de 0,200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com recuperação média de 102% e desvio padrão relativo de 4,72% ( $n = 6$ ). Os respectivos resultados de recuperação para a transição de quantificação ( $m/z$  321>152) são sumarizados na Tabela 4 e apresentam-se em conformidade com a faixa de recuperação média recomendada pela Comunidade Européia (“Commission Decision 2002/657/EC”) que compreende recuperações entre 50 e 120%<sup>37</sup>.

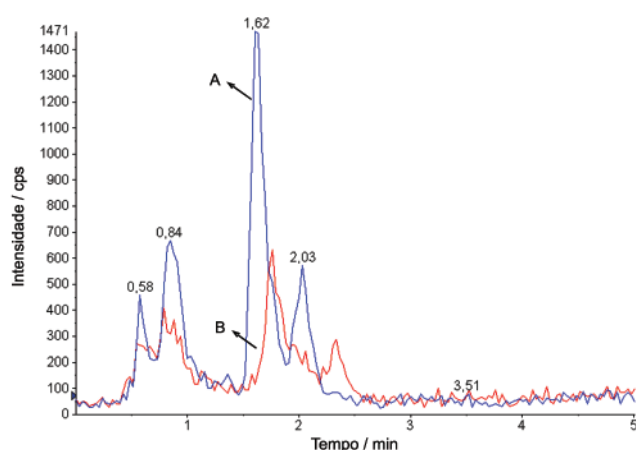
**Tabela 4.** Resultados de recuperação do método para amostras de leite e mel

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1} / \mu\text{g kg}^{-1}$ )	Rec. (%)	DP	DPR (%)	n
Leite	0,05	92,8	0,005	5,49	6
Leite	0,10	93,9	0,012	6,36	6
Leite	1,00	93,4	0,157	8,41	6
Mel	0,20	102,0	0,002	4,72	6

As Figuras 8 e 9 mostram os cromatogramas (“Total Ion Chromatogram” – TIC) das amostras fortificadas nos níveis de 0,050 e 0,200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em leite e mel, respectivamente. Nestas figuras, observam-se a detecção das transições do CAP livre de interferentes da matriz.



**Figura 8.** A = Cromatograma (“Total Ion Chromatogram” – TIC) da amostra de leite fortificada no nível de  $0,050 \mu\text{g L}^{-1}$  (conc. final injetada  $0,100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e B = Cromatograma (“Total Ion Chromatogram” – TIC) de amostra de leite testemunha



**Figura 9.** A = Cromatograma (“Total Ion Chromatogram” – TIC) da amostra de mel fortificada no nível de  $0,20 \mu\text{g kg}^{-1}$  (concentração final injetada  $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e B = Cromatograma (“Total Ion Chromatogram” – TIC) de amostra de mel testemunha

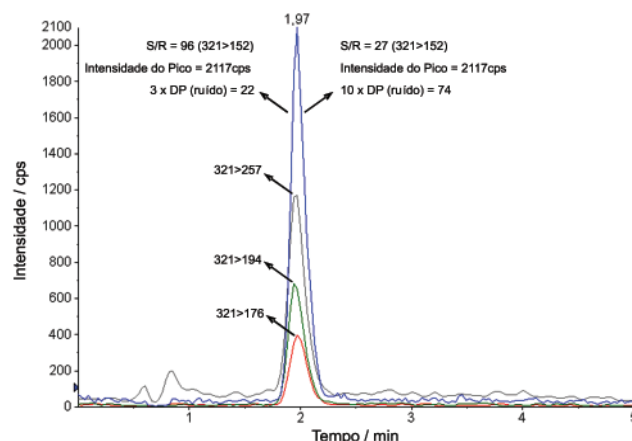
### Limite de detecção e quantificação

A técnica apresentou alta sensibilidade medida para a transição de quantificação  $m/z$  321>152, onde o Limite de Detecção (LD) foi de  $0,520 \text{ ng L}^{-1}$  ( $S/R = 3$ ) e o Limite de Quantificação (LQ) de  $1,850 \text{ ng L}^{-1}$  ( $S/R = 10$ ). A Figura 10 apresenta um cromatograma da amostra de leite fortificado com  $0,025 \text{ ng mL}^{-1}$  de CAP (concentração final da solução injetada  $0,050 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

### Avaliação de amostras comerciais

Após a otimização do método para baixos limites de determinação, quatro amostras de leite integral, três amostras de leite em pó e quatro amostras de mel de diferentes marcas foram adquiridas em supermercado localizado na região metropolitana de São Paulo e encaminhadas ao laboratório, onde permaneceram refrigeradas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento das análises. As amostragens foram feitas por escolha de marcas nacionais expressivas no mercado, com exceção de uma amostra de mel importada. A Tabela 5 apresenta os resultados das amostras analisadas, onde a presença

do composto CAP foi determinada em uma marca de leite integral e duas marcas de leite em pó. A Figura 11 apresenta o cromatograma da amostra de leite comercial “LP-A”, onde o composto CAP foi determinado, e o padrão de referência de  $0,050 \text{ ng mL}^{-1}$ , analisados em seqüência. O critério de identificação e con-

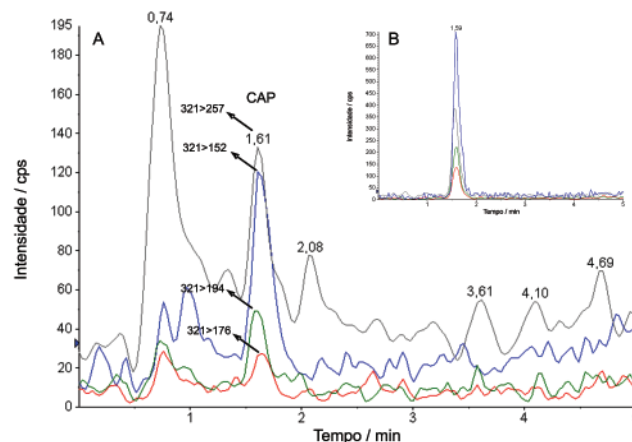


**Figura 10.** Cromatograma (“Extract Ion Chromatogram” – XIC) da amostra de leite fortificada com  $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$  de CAP (concentração final injetada  $0,050 \text{ ng mL}^{-1}$ )

**Tabela 5.** Resultados das amostras comerciais analisadas

Amostra	Concentração ( $\text{ng L}^{-1}/\text{ng kg}^{-1}$ )
Leite “LI-A”	n.d.
Leite “LI-B”	4,73
Leite “LI-C”	n.d.
Leite “LI-D”	n.d.
Leite “LP-A”	5,90
Leite “LP-B”	6,10
Leite “LP-C”	n.d.
Mel “M-A”	n.d.
Mel “M-B”	n.d.
Mel “M-C”	n.d.
Mel “M-D”	n.d.

“LP” Leite em pó; “LI” Leite Integral.



**Figura 11.** A = Cromatograma (“Extract Ion Chromatogram” – XIC) da amostra de leite “LP-A” contendo  $5,900 \text{ ng L}^{-1}$  de CAP e B = Cromatograma (“Extract Ion Chromatogram” – XIC) da amostra de padrão de  $0,050 \text{ ng mL}^{-1}$  de CAP

firmação do composto CAP nas amostras comerciais é fundamentado pela presença dos picos cromatográficos nas quatro transições monitoradas em modo MRM no espectrômetro de massas. Nas amostras de mel analisadas não foi detectada a presença deste composto.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado um método analítico para determinação de resíduos de CAP em amostras de leite e mel, em conformidade com a Comissão de Decisão 2003/181/EC da Comunidade Europeia e a proposta da ANVISA, através do Programa PAMVet. Foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em “tandem” com ionização por “electrospray” (CLAE-ESI/EM/EM), como uma alternativa eficiente e adequada à determinação de resíduos de antibióticos em matrizes de alimentos. Nesta técnica, a operação do espectrômetro de massas triploquadrupolar em modo MRM, através do monitoramento de transições de  $m/z$  entre o íon precursor (analito) e seus íons produto gerados em dissociações por CID, conferiu à metodologia baixos limites de detecção e quantificação. Os resultados mostraram que a técnica de CLAE-ESI/EM/EM é uma ferramenta analítica de alta especificidade, detectabilidade e auto-confirmatória na determinação dos analitos em matrizes de alimentos.

A metodologia analítica de determinação de CAP foi aplicada à avaliação de amostras comerciais de leite e mel nacionais, com o intuito de verificar uma possível utilização deste composto na pecuária e na apicultura. Em algumas amostras comerciais de leite, adquiridas em mercado local, foram identificadas a presença do CAP, no entanto, nas amostras comerciais de mel analisadas, não foi detectada a presença do composto. Estes resultados mostram a necessidade de programas de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, o que é imprescindível para garantir a qualidade dos mesmos e, conseqüentemente, a saúde dos consumidores.

## AGRADECIMENTOS

À parceria público/privada entre o Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN e a Applied Biosystems do Brasil Ltda, através da qual foi possível a realização deste trabalho. Aos funcionários das duas instituições envolvidas na parceria, pelo apoio e confiança. À Applied Biosystems do Brasil e à CAPES pela bolsa de estudo e apoio financeiro concedidos, e por fim, ao grupo de laboratórios do PAMVet por incentivar este projeto.

## REFERÊNCIAS

1. Stedman, T. C.; *Stedman's Medical Dictionary*, 25ª ed., Guanabara: Rio de Janeiro, 1996, p. 239.
2. Commission Regulation 1430/94 of 22 June 1994; *Off. J. Eur. Commun.* **1994**, L156, 6.
3. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996; *Off. J. Eur. Commun.* **1996**, L125, 10.

4. Council Directive 97/78/EC of 18 December 1997; *Off. J. Eur. Commun.* **1997**, L24, 9.
5. Commission Decision 2001/699/EC of 19 September 2001; *Off. J. Eur. Commun.* **2001**, L251, 11.
6. Commission Decision 2002/69/EC of 30 January 2002; *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, L30, 50.
7. Writing Questions 2002/C 301 E/092) 18 April 2002; *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, C301, E/88.
8. [www.cienciadoleite.com.br/contaminacao/leite.htm](http://www.cienciadoleite.com.br/contaminacao/leite.htm), acessada em Janeiro 2005.
9. <http://www.anvisa.gov>, acessada em Janeiro 2005.
10. Commission Decision 2003/181/EC of 30 January 2002; *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, L30, 50.
11. Bossuyt, R.; Renterghem R. V.; Waes, G.; *J. Chromatogr. A* **1976**, 124, 37.
12. Ramírez, A.; Gutiérrez, R., Díaz G.; González C.; Pérez, N.; Vega, S.; Noa, M.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 784, 315.
13. Wal, J. M.; Pelera, J. C.; Bories, G.; *J. Chromatogr. A* **1979**, 168, 179.
14. Akhtar, M. H.; Danis, C.; Sauve, A.; Barry, C.; *J. Chromatogr. A* **1995**, 696, 123.
15. Pefenning, A. P.; Madson, M. R.; Roybal, J. E.; Turnipseed, S. B.; Gonzales, S. A.; Hurlbut, J. A.; Salmon, G. D.; *J. AOAC Int.* **1998**, 81, 714.
16. Pefenning, A. P.; Roybal, J. E.; Rupp, H. S.; Turnipseed, S. B.; Gonzales, S. A.; Hurlbut, J. A.; *J. AOAC Int.* **2000**, 83, 26.
17. Nakagawa, T.; Masada, M.; Uno, T.; *J. Chromatogr. A* **1975**, 111, 355.
18. Santos, L.; Barbosa, J.; Castilho, M. C.; Ramos, F.; Ribeiro, C. A. F.; Silveira, M. I. N.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 249.
19. Long, A. R.; Hsieh, L. C.; Bello, A. C.; Malbrough, M. S.; Short, C. R.; Baker, S. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 427.
20. Perez, N.; Gitierrez, R.; Noa, M.; Diaz, G.; Luna, H.; Escobar, I.; Munive, Z.; *J. AOAC Int.* **2002**, 85, 20.
21. van de Reit, J. M.; Potter, R. A.; Fougere, M. C.; Burns, G.; *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 501.
22. Ramos, M.; Muñoz, P.; Aranda, A.; Rodriguez, I.; Diaz, R.; Blanca, J.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 791, 31.
23. Takino, M.; Daishima, S.; Nakahara, T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 1011, 65.
24. Penney, L.; Smith, A.; Coates, B.; Wijewickreme, A.; *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 645.
25. Sorensen, L. K.; Elbaek, T. H.; Hansen, H.; *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 703.
26. Mottier, P.; Parisod, V.; Gremaud, E.; Guy, P. A.; Stadler, R. H.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 994, 75.
27. Du, A. Y.; Jones, L. J.; Basa, L. J.; Chen, L.; Li, W.; *51ª Conferência da ASMS*, Montreal, Canadá, 2003.
28. Bogusz, M. J.; Hassan, H.; Al-Enazi, E.; Ibraim, Z.; Al-Tufail, M.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, 807, 343.
29. Nieland, B.; Blake, D. K.; Baynham, M. T.; Lock, S. J.; Schoutsen, F.; Thomas, D.; *52ª Conferência da ASMS*, Nashville, Estados Unidos, 2004.
30. Joelsson, K.; Hynning, P. A.; *52ª Conferência da ASMS*, Nashville, Estados Unidos, 2004.
31. Guy, P. A.; Royer, D.; Mottier, P.; Gremaud, E.; Perisset, A.; Stadler, R. H.; *J. Chromatogr. A* **2004**, 1054, 365.
32. Forti, A. F.; Campana, A.; Simonela, A.; Scortichini, G.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 257.
33. Ferguson, J.; Baxter, A.; Young, P.; Kennedy, G.; Elliott, C.; Weigel, S.; Gatermann, R.; Ashwin, H.; Stead, S.; Sharman, M.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 109.
34. Ashwin, H.; Stead, S. L.; Taylor, J. R.; Richardmond, S. F.; Homer, V.; Bigwood, T.; Sharman, M.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 103.
35. Hormazabal, M.; Yndestad, M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24, 2477.
36. Oresnik, K.; Bedek, M.; Bericnik-Vrbovsek; Balizs, G.; *16ª Conferência Internacional de Espectrometria de Massas*, Edimburgo, Escócia, 2003.
37. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002; *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, L221, 8.