

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA ESPECTROFOTOMETRIA DE UV/VIS NA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM EXTRACTOS DE LEITE DE VACA

Cátia C. Guedes

Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
13509@ufp.edu.pt

Carla M. Matos

Professora Auxiliar
CIAGEB, Faculdade de Ciências de Saúde – UFP
cmatos@ufp.edu.pt

Carla G. Moutinho

Professora Auxiliar
CIAGEB, Faculdade de Ciências de Saúde – UFP
IBB – U Minho
carlamo@ufp.edu.pt

Carla Sousa e Silva

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia – UP
sousasil@ufp.edu.pt

RESUMO

A comercialização da maior parte dos alimentos é precedida por um processamento complexo, o qual necessita de ser devidamente monitorizado, de forma a controlar a presença de substâncias nocivas. No entanto, estas substâncias, designadamente antibióticos, são necessárias no combate de diversas patologias veterinárias, pelo que são administradas aos animais de consumo. Este estudo foi desenvolvido com o objectivo de testar e otimizar um método de extracção de resíduos de antibióticos do leite de vaca gordo pasteurizado.

PALAVRAS-CHAVE

Leite; Espectrofotometria de UV-Vis; sulfamerazina; oxitetraciclina; cloranfenicol.

ABSTRACT

The marketing of most food is preceded by a complex process, which needs to be properly monitored in order to supervise the presence of harmful substances. However, these substances, including antibiotics that are administrated to consumption animals, are necessary in combating of various veterinary diseases. This study was developed with the aim to test and optimize a method for extraction of antibiotic residues in cow's pasteurized milk.

KEYWORDS

Milk; UV-Vis spectrophotometry; sulfamerazine; oxytetracycline; chloramphenicol.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um líquido produzido pela secreção das glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos (Matos et al., 2007). Por ser um alimento de elevado potencial nutritivo, é muito susceptível à actividade microbiana. Devido a esta contaminação, o leite necessita de processos industriais, tais como a elevação da temperatura, para destruir os agentes patogénicos e permitir a sua conservação.

A classificação do leite é efectuada com base na quantidade de microrganismos presentes. Existem diversos tipos de leite. O leite pasteurizado pode ser classificado em tipo A, B ou C, de acordo com o grau de qualidade que apresenta. O tipo A é pasteurizado logo após a ordenha mecânica executada na exploração com o máximo de higiene. O tipo B é transportado até 6 horas após a ordenha, para que seja pasteurizado e o tipo C é obtido por ordenha manual. O leite tipo UHT (*ultra high temperature*) é sujeito ao tratamento UHT. Neste tratamento o leite é homogeneizado e sujeito a temperaturas elevadas, durante 2 a 4 segundos e, seguidamente, é arrefecido a uma temperatura inferior a 32° C. A este tipo de leite são adicionados estabilizantes químicos, separadamente ou combinados, como por exemplo, o citrato, o monofosfato e o trifosfato de sódio. Existe ainda o leite desidratado, que se pode apresentar na forma de pó, evaporado e condensado. O leite em pó pode ser integral, desnatado e modificado. Este tipo de leite é elaborado especialmente para alimentação infantil, sendo modificado nutricionalmente a nível das proteínas, vitaminas e minerais (Popelka et al., 2004).

Os principais animais fornecedores de leite para consumo humano são a vaca, a ovelha e a cabra, sendo a primeira a principal fonte de produção de leite. Apesar de ser líquido, o leite de vaca possui, em média, 13 % de sólidos. Contém, para além da água, lípidos, hidratos de carbono, proteínas, minerais, vitaminas e outros constituintes. Este é dotado de uma enorme riqueza nutricional. É uma fonte de proteínas de elevado valor biológico; é rico em minerais, em vitaminas (A, B₂, B₁₂, PP, K, B₁ e ácido pantoténico) e oligoelementos, sobretudo selénio e iodo. A composição do leite de vaca sofre a influência de diversos factores, tais como, raça, período de lactação, quantidade e qualidade da alimentação, época do ano e estado de saúde do animal (Popelka et al., 2004).

Os antibióticos são utilizados tanto em medicina humana, como veterinária. Para controlar as concentrações destes resíduos em produtos alimentares desenvolveram-se métodos analíticos de rastreio. A técnica analítica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) tem sido a mais usada na quantificação de resíduos de antibióticos no leite e na carne (Wang et al., 2006). Neste trabalho pretendeu-se estabelecer um método de extracção de resíduos de antibióticos do leite de vaca pasteurizado, procedendo, posteriormente, à sua optimização. Foi escolhido o método referido por Tolentino et al. (2005), em que foram efectuadas algumas modificações.

1.1. ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINÁRIO

Os medicamentos anti-infecciosos mais usados pelos produtores são os antibióticos beta-lactâmicos, os aminoglicosídeos, os macrólidos e aparentados, as tetraciclina, o cloranfenicol, as quinolonas, as sulfonamidas, as associações de antibióticos e as associações de antibióticos com outros fármacos (tabela 1). Neste estudo, foram submetidos ao processo analítico os antibióticos oxitetraciclina, sulfamerazina e cloranfenicol.

Tabela 1. Medicamentos anti-infecciosos para uso veterinário.

| MEDICAMENTOS ANTI-INFECCIOSOS PARA USO VETERINÁRIO | | |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Antibióticos beta-lactâmicos | Sulfonamidas de rápida absorção, rápida eliminação | Derivados do furano |
| Penicilinas | Sulfonamidas de rápida absorção, lenta eliminação | Associações de nitrofuranos |
| Penicilinas sintéticas e semi-sintéticas | Sulfonamidas pouco absorvidas | Outros nitrofuranos |
| Cefalosporinas | Associações de sulfonamidas | Outros antibióticos |
| Aminoglicosídeos | Associações de sulfonamidas com outros antibióticos | Associações de antibióticos |
| Macrólidos e aparentados | Associações de sulfonamidas com outros agentes anti-microbianos | Associações de antibióticos com outros fármacos |
| Tetraciclina | Sulfonamidas para usos especiais | Anti-fúngicos |
| Cloranfenicol | Nitrofurazona | Anti-virais |
| Quinolonas | Furazolidona | Tuberculostáticos e anti-leprolíticos |
| Sulfonamidas | Nitrofurantoína | Outros agentes anti-microbianos |

1.2. LIMITE DE SEGURANÇA DE ALGUNS ANTIBIÓTICOS

Os fármacos de uso veterinário são usados para a protecção da saúde e bem-estar dos animais e também na prevenção da transmissão de doenças dos animais ao Homem. Uma utilização incorrecta destes fármacos pode induzir ao aparecimento de resíduos potencialmente nocivos nos alimentos de origem animal. É, desta forma, essencial assegurar o controlo da sua utilização, salvaguardando a segurança alimentar e a saúde pública. A monitorização dos resíduos de antibióticos é muito importante, uma vez que existe a possibilidade de desenvolvimento de reacções alérgicas ou tóxicas em indivíduos susceptíveis. Para além destes riscos, uma exposição a longo prazo aos resíduos daqueles fármacos pode potenciar um aumento da resistência bacteriana. Com o objectivo de certificar a segurança do consumidor, deve ser realizada uma avaliação dos resíduos de todas as substâncias farmacologicamente activas, componentes de especialidades de uso veterinário destinados a animais produtores de alimentos, de acordo com o Regulamento (CEE) nº 2377/90 do Conselho. Esta avaliação consiste na determinação da Dose Diária Admissível (DDA) a partir da qual são estabelecidos os limites máximos de resíduo (LMR). Várias organizações têm vindo a estabelecer os LMR no leite para os fármacos. No caso da oxitetraciclina o LMR é de 100 µg/kg (Jevinova et al., 2003), para as sulfonamidas o limite estabelecido é de 100 µg/kg (Tolentino et al., 2005). Relativamente à penicilina G, ampicilina e amoxicilina o LMR é de 4 µg/Kg e para a oxitilina, cloxicilina e dicloxacilina é de 30 µg/Kg. Quanto ao antibiótico cloranfenicol não está estabelecido um LMR, porque este antibiótico foi proibido para uso veterinário. No entanto, o "Council Regulation" (EEC) nº 2377/90 e as suas adendas estipulam, para a União Europeia, que o LMR do cloranfenicol seja igual a 0 µg/Kg.

1.3. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS DO LEITE

Na determinação de vários antibióticos em diversas amostras biológicas são usadas técnicas de detecção, tais como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), cromatografia líquida com detecção ultravioleta (LC/UV), cromatografia líquida com detecção fluorescente (LC/FLD), cromatografia líquida com detecção *diodo array* (LC/DAD) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS). As técnicas GC/MS e LC/FLD necessitam de derivatização, ao contrário da LC/MS.

Correntemente, a técnica analítica mais usada na detecção de antibióticos tem sido a HPLC, seguida pelo ensaio imunoabsorvente com ligação enzimática (ELISA), pelo imunoensaio

biossensor (BIA) e pelo ensaio microbiológico. São poucos os métodos usados baseados na cromatografia gasosa (GC), na electroforese capilar de alta pressão (HPCE) ou na cromatografia em camada fina (TLC) (Wang et al., 2006).

1.3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO (HPLC)

A técnica HPLC é a mais utilizada na determinação de resíduos de antibióticos no leite, carne e aves, existindo um grande número de trabalhos científicos publicados (Wang et al., 2006). As práticas mais comumente utilizadas para a extracção e purificação dos antibióticos das matrizes biológicas envolvem primeiramente a extracção líquido-líquido ou a extracção em fase sólida (SPE) (Tuerk et al., 2006).

A separação cromatográfica é frequentemente efectuada com colunas C_{18} e C_8 , sendo as mais comuns as de fase reversa (Furusawa, 1999; Tolentino et al., 2005). As fases móveis, na maioria dos casos, consistem em misturas de acetonitrilo-água, mas também são usadas misturas de acetonitrilo-ácido acético, acetonitrilo-tampão acetato de amónio e ainda misturas ternárias de ácido oxálico-metanol-acetonitrilo (Msagati e Nindi, 2004; Tolentino et al., 2005; Tuerk et al., 2006). O acetonitrilo é bastante usado como fase móvel, pois diminui a retenção da maioria dos fármacos hidrofóbicos e aumenta a eficiência da separação (Caballero et al., 2001).

Tolentino et al. (2005) apresentaram um método em que usaram a técnica HPLC com detecção UV, utilizando como fase móvel uma solução tampão de acetato de sódio a pH 4,8 para analisar resíduos de sulfonamidas no leite. O dodecil sulfato de sódio (SDS) ou o acetato de sódio são frequentemente adicionados a estes sistemas para aumentar a eficácia da separação.

O comportamento de retenção das sulfonamidas é dependente, não apenas da polaridade da fase móvel, mas também da sua ionização. O pH da fase móvel desempenha um papel importante na separação cromatográfica, estando o pH óptimo da solução tampão compreendido entre 5,0-7,0 (Msagati e Nindi, 2004; Wang et al., 2006).

No método descrito por Furusawa (1999) a oxitetraciclina foi detectada no leite, tendo-se obtido um índice de recuperação entre 89,8 % e 94,1 %.

Cinquina et al. (2003) usaram a HPLC/DAD na detecção de oxitetraciclina em leite e músculo de bovinos. Foi usada a solução padrão McIlvaine e TCA, tendo sido obtidos índices de recuperação superiores a 81 % nas amostras de leite e acima de 83,2 % nas amostras de músculo.

O cloranfenicol foi analisado em diversas amostras, tais como urina, leite pasteurizado, tecido animal de porco, peru e truta. Tuerk et al. (2006) efectuaram uma comparação entre o método de HPLC com diferentes detecções, UV e MS. Os autores concluíram que as detecções UV e MS são úteis para o controlo das determinações, porque a precisão e exactidão associada a este método permitem determinar os antibióticos com elevada sensibilidade.

Para Popelka e colaboradores (2004) a detecção de resíduos de penicilina no leite por HPLC necessita do passo de purificação e derivatização.

A exactidão e linearidade do método HPLC/LC/MS são adequadas para a monitorização da qualidade de ração. Esta técnica pode ser utilizada para identificar e quantificar fármacos em rações de forma rápida, simples e económica (Wang et al., 2006).

1.3.2. CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

Santos et al. (2005) usaram a GC/MS para detectar resíduos de cloranfenicol em músculo de truta e a LC/MS para confirmar os resultados de amostras suspeitas, pois esta apresenta elevada sensibilidade, sem necessidade de derivatização. O reagente de derivatização do cloranfenicol é uma mistura de hexametildisilano-trimetilclorossilano-piridina, na proporção 2:1:10. A técnica de GC exige um procedimento trabalhoso, pelo que existem poucos trabalhos publicados.

1.3.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA (TLC)

A utilização da técnica de TLC para análise quantitativa das sulfonamidas pode reduzir o uso de solvente e o custo da análise. Wang et al. (2006) efectuaram a análise das sulfonamidas de amostras de leite, em que a preparação da amostra incluiu uma extracção líquido-líquido com clorofórmio e SPE. A detecção foi realizada por fluorescência induzida e obtiveram-se índices de recuperação na ordem dos 88,3-103,2 %.

1.3.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)

Ribone et al. (2001) analisaram os princípios activos (sulfatiazol, rivanol e antipirina) em gotas otológicas usando o método de UV/Vis, complementado pela análise de calibração multivariada. Este método tem como vantagem não necessitar de derivatização nem de solventes não aquosos. Com este procedimento analítico obtiveram-se os seguintes índices de recuperação: para o sulfatiazol 108 %, para o rivanol 98 % e para a antipirina 102 %.

Fan et al. (2003) determinaram a sulfadiazina e o sulfametoxazol na urina e em preparações farmacêuticas, tendo utilizado a injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. Obtiveram resultados razoáveis, em termos de selectividade, exactidão e precisão num largo intervalo de concentrações e com uma elevada frequência de amostragem. Além disso, este método é rápido, simples e sensível, sendo os limites de detecção 0,05 µg/mL para o sulfametoxazol e 0,06 µg/mL para a sulfadiazina.

1.3.5. MÉTODO MICROBIOLÓGICO MODIFICADO PARA O RASTREIO DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE

Os resíduos de antibióticos no leite podem ser detectados por diferentes métodos: testes com base na inibição do crescimento microbiano, testes imunológicos, testes que usam receptores e enzimas e também alguns testes físico-químicos, como por exemplo, a TLC.

Estes testes são qualitativos, quantitativos ou semi-quantitativos. O teste denominado "*Bacillus stearothermophilus calidolactis disc assay*" (BSDA) é um exemplo de teste microbiológico-

co de rastreio usado diariamente na indústria para determinar resíduos de antibióticos no leite de vaca. Este teste tem por base a inibição de crescimento microbiano, em que uma amostra de leite é submetida ao contacto com um microorganismo sensível (*Bacillus stearothermophilus*) (Bates et al., 2002).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os compostos foram usados sem qualquer purificação adicional e obtidos dos seguintes fornecedores: acetato de sódio anidro (Sigma), ácido acético glacial (RPE, Carlo Erba reagents), água desionizada (InterLab Deioniser Portugal), acetona (Fluka), *n*-hexano 95 % (Panreac Química SA, PAI), clorofórmio (RPE, Carlo Erba reagents), leite pasteurizado gordo tipo B (Vigor), metanol (Merck).

A solução de extracção, composta por clorofórmio-acetona (67%/33%, v/v), foi sempre preparada diariamente. Todos os antibióticos (sulfamerazina, oxitetraciclina e cloranfenicol) foram obtidos da Sigma. As soluções dos antibióticos foram mantidas ao abrigo da luz para minimizar a sua decomposição e à temperatura de 5 °C. Os intervalos das concentrações dos padrões estudados foram os seguintes: 1,06 µg/mL - 10,6 µg/mL para a sulfamerazina; $24,8 \times 10^{-1}$ µg/mL - $99,0 \times 10^{-1}$ µg/mL para a oxitetraciclina e 5,94 x µg/mL - $2,97 \times 10^1$ µg/mL para o cloranfenicol. A solução tampão foi preparada com água bidesionizada apresentando condutividade inferior a 0,1 µS cm⁻¹. As soluções mais concentradas de antibióticos foram obtidas por pesagem rigorosa dos sólidos, seguida de dissolução. As soluções mais diluídas foram preparadas a partir das anteriores por diluição rigorosa.

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.2.1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A partir de uma solução concentrada de antibiótico (1mg/mL), mediui-se o volume apropriado (sulfamerazina 140 µL, oxitetraciclina 420 µL, cloranfenicol 370 µL) para um balão volumétrico de 250 mL, perpez-se com leite pasteurizado gordo e homogeneizou-se. As amostras assim preparadas foram distribuídas por tubos Falcon, identificadas, protegidas com papel de alumínio e parafilme e congeladas. O leite não alíquotado (leite sem antibiótico adicionado) foi condicionado e armazenado da mesma forma (branco).

2.2.2. EXTRACÇÃO DA AMOSTRA

O método proposto por Tolentino et al. (2005) foi utilizado com ligeiras modificações, de forma a simplificar as etapas de extracção e, principalmente, reduzir os volumes de leite e reagentes utilizados neste estudo. Mediram-se rigorosamente 5,00 mL de leite para um tubo Falcon, adicionaram-se 25 mL da solução de extracção e 10 mL de água desionizada. Agitou-se vigorosamente durante 2 minutos. Centrifugou-se a 6000 rpm, durante 15 minutos. Recolheu-se a fase orgânica num balão de fundo redondo e repetiu-se a extracção com a fase aquosa remanescente.

2.2.3. TRATAMENTO DA AMOSTRA

Evaporaram-se os extractos orgânicos contidos no balão de fundo redondo de 50 mL até à secura num evaporador rotativo a 32 °C. Adicionou-se ao resíduo 1,5 mL de solução tampão de acetato de sódio, agitou-se no vórtex durante 1 minuto, acrescentaram-se 5 mL de *n*-hexano e agitou-se novamente 1 minuto no vórtex.

Transferiu-se o conteúdo do balão para um tubo cónico e deixaram-se separar as fases durante 2 minutos. Agitou-se no vórtex por 1 minuto e seguidamente centrifugou-se a 4000 rpm, durante 15 minutos. Transferiu-se a camada aquosa para um *ependorf* de 1,5 mL e procedeu-se ao ensaio espectrofotométrico.

2.2.4. ENSAIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

As determinações espectrofotométricas de UV foram efectuadas, à temperatura ambiente, usando um espectrofotómetro da PerkinElmer Lambda 25 e cuvetes de quartzo de volume reduzido de 1 cm de percurso óptico.

Os espectros foram traçados contra uma solução tampão de acetato de sódio, fazendo-se um varrimento a uma velocidade de 600 nm/min. O procedimento anteriormente referido nas diversas alíneas foi efectuado de igual forma, tanto para o branco, como para a amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dado não haver alteração significativa entre os espectros de absorvância do branco e da oxitetraciclina extraída do leite, não foi possível determinar o seu índice de recuperação. Este facto deve-se, principalmente, a efeitos de quelatação com iões cálcio. O conhecimento das interacções sofridas pelas tetraciclinas com metais permite uma melhor compreensão da sua actuação em mecanismos fisiológicos específicos e o planeamento de métodos de doseamento mais eficazes e rápidos. Dados obtidos por espectrofotometria permitem concluir que o local de ligação das tetraciclinas a metais situa-se no grupo enolizado β -dicetonico em C₁₁-C₁₂. Admite-se que estes fármacos se comportam como ligandos bidentados que formam quelatos com catiões cálcio (Couto et al., 2000).

Segundo Couto e colaboradores (2000) devido ao facto de, na sua estrutura química, existir um grande número de possíveis locais de ligação, as tetraciclinas em solução formam, com grande facilidade, complexos metálicos e esta quelatação pode interferir na absorção e actividade da molécula. A formação de complexos também pode influenciar a biodisponibilidade do fármaco. Quando se ingere, concomitantemente, leite e/ou lacticínios com tetraciclinas ou com sais ferrosos, há a formação de compostos de cálcio de baixa solubilidade, ocorrendo uma diminuição da quantidade de fármaco disponível para exercer efeito terapêutico.

A lei de Lambert-Beer foi verificada para todas as soluções ensaiadas e nas condições experimentais utilizadas. Nas figuras 1 e 2 apresentam-se, respectivamente, os espectros de UV/Vis das soluções padrão de sulfamerazina e de cloranfenicol, em tampão de acetato de sódio.

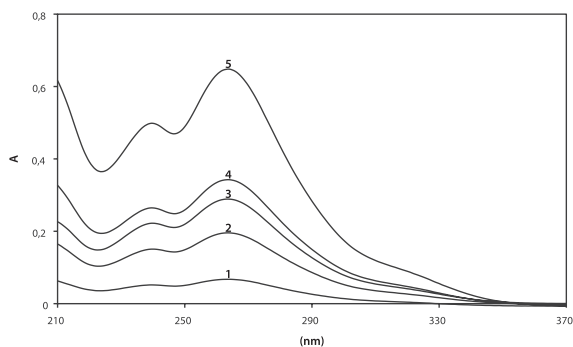


Figura 1. Espectros de UV/Vis de soluções padrão de sulfamerazina com diferentes concentrações (1,06 $\mu\text{g/mL}$ (1); 3,18 $\mu\text{g/mL}$ (2); 5,30 $\mu\text{g/mL}$ (3); 6,36 $\mu\text{g/mL}$ (4); 10,6 $\mu\text{g/mL}$ (5)), traçados a uma velocidade de varrimento de 600 nm min^{-1} .

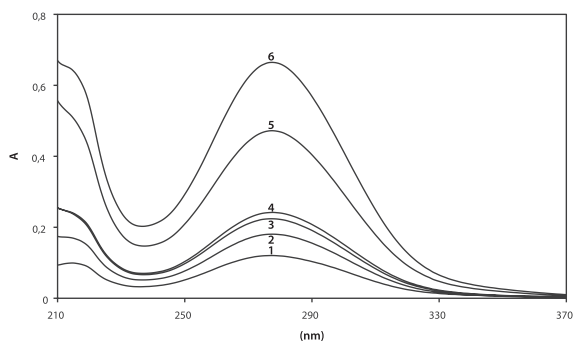


Figura 2. Espectros de UV/Vis de soluções padrão de cloranfenicol de diferentes concentrações (5,94 $\mu\text{g/mL}$ (1); 7,92 $\mu\text{g/mL}$ (2); 8,91 $\mu\text{g/mL}$ (3); 9,90 $\mu\text{g/mL}$ (4); $1,98 \times 10^1 \mu\text{g/mL}$ (5); $2,97 \times 10^1 \mu\text{g/mL}$ (6)), traçados a uma velocidade de varrimento de 600 nm min^{-1} .

Pela análise dos espectros de absorção de soluções padrão de antibióticos, verifica-se que a sulfamerazina e o cloranfenicol apresentam bandas de absorção na zona do UV, nomeadamente por volta dos 240 e 268 nm, e 278 nm, respectivamente.

Na figura 3 é possível visualizar uma representação gráfica do máximo de absorvância (A_{max}) em função da concentração dos antibióticos estudados, onde se obteve uma relação linear. Esta relação representada pela equação da recta respectiva, permitiu determinar, por interpolação, o valor da concentração dos antibióticos extraídos do leite de vaca.

Após a extracção dos antibióticos, sulfamerazina e cloranfenicol, das amostras de leite de vaca, foram traçados os espectros de UV/Vis das respectivas soluções, como se pode observar nas figuras 4 e 5. Nestes gráficos verifica-se que os espectros correspondentes às amostras não são sobreponíveis, o que deveria acontecer, porque se trata da mesma substância e também por ter sido usada a mesma quantidade da mesma solução padrão de antibiótico. Este facto pode ser explicado, por problemas inerentes ao método extractivo e à técnica de quantificação.

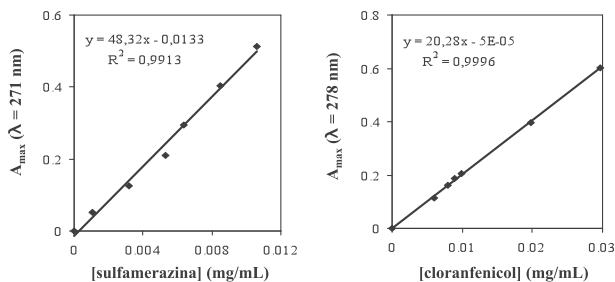


Figura 3. Representação gráfica da variação dos valores de absorvância máxima (curvas de calibração) em função da concentração de sulfamerazina e de cloranfenicol.

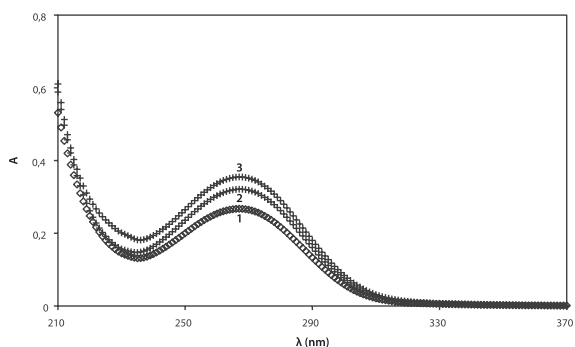


Figura 4. Espectros de UV/Vis de soluções submetidas ao processo de extração utilizado, branco (1) e com sulfamerazina (2 e 3). Ambas as amostras contêm sulfamerazina na mesma concentração.

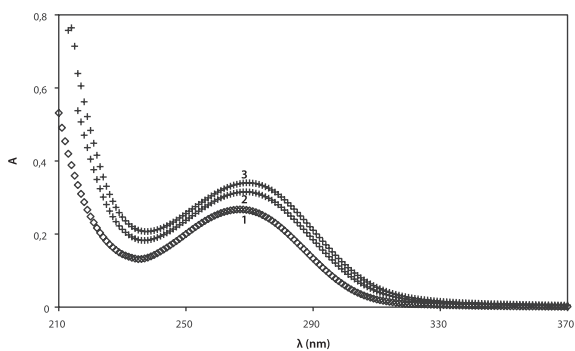


Figura 5. Espectros de UV/Vis de soluções submetidas ao processo de extração utilizado, branco (1) e com cloranfenicol (2 e 3). Ambas as amostras contêm cloranfenicol na mesma concentração.

Os parâmetros, nomeadamente, os índices de recuperação (IR), os desvios padrão (DP) e os coeficientes de variação (CV), calculados neste trabalho são apresentados na tabela 2. Pela análise desta tabela, pode verificar-se que os valores de índice de recuperação dos dois antibióticos estudados não são da mesma ordem de grandeza dos determinados por técnicas de HPLC, TLC, GC/MS. Na pesquisa efectuada na bibliografia encontraram-se IR de 61,0 % a 104,4 % para estes antibióticos extraídos de amostras de leite.

Tabela 2. Valores de índices de recuperação (IR) e respectivos desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), calculados a partir de sete experiências independentes.

| Antibiótico | IR (%) | DP (%) | CV (%) |
|---------------|--------|--------|--------|
| Sulfamerazina | 48,6 | 15,0 | 30,8 |
| Cloranfenicol | 48,7 | 11,0 | 22,9 |

A partir da análise dos coeficientes de variação, evidencia-se que os CV do cloranfenicol são mais consistentes, comparativamente com os determinados na extração da sulfamerazina.

Um elevado índice de recuperação, juntamente com um CV inferior a 25 % e um tempo de análise curto, indicam que o método possui boa precisão e exactidão e pode ser útil na monitorização de resíduos no leite. Relativamente aos resultados obtidos apenas se obteve um CV inferior a 25 % (para a sulfamerazina 30,8 % e para o cloranfenicol 22,9 %), sendo os índices de recuperação abaixo dos 50 % e o tempo de análise longo. Logo, a regra acima referida não se aplica.

A escolha do método de extração de resíduos de antibióticos do leite é feita geralmente com base nos índices de recuperação, no tipo de material, no tempo de análise, no equipamento, na exactidão, na reprodutibilidade, entre outros. Neste trabalho a execução experimental demonstrou ser uma técnica bastante morosa (em média 5 horas) e laboriosa. Além disso, a técnica de espectrofotometria de UV/Vis utilizada neste estudo não é um método apropriado a este tipo de trabalho, embora a instrumentação empregue seja corrente na maioria dos laboratórios. Os resultados obtidos por espectrofotometria são, em geral, menos precisos do que os obtidos por HPLC, GC/MS, LC/MS e ELISA, no entanto, a espectrofotometria de UV/Vis revelou-se uma técnica analítica rápida e facilmente exequível, embora as amostras de leite de vaca tenham sido adulteradas com os antibióticos em estudo em concentrações superiores aos LMR.

BIBLIOGRAFIA

- BATES, N. M.; SELEVAN, G. S.; ELLERBER, M. S.; GARTNER, M. L. (2002). Reporting Needs for Studies of Environmental Chemicals in Human Milk. *In: Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65, pp. 1867-1879.
- CABALLERO, R. D.; TORRES-LAPÁSIO, J. R.; BAEZA-BAESA, J. J.; GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M. C. (2001). Micellar chromatography procedure with direct injection for the determination of sulphonamides in milk and honey samples. *In: Journal Liquid Chromatography and Related Technology*, 24(1), pp. 117-131.
- CINQUINA, A.L.; LONGO, F.; ANASTASI, G.; GIANETTI, L.; COZZANI, R. (2003). Validation of a Highperformance Liquid Chromatography Methods for the Determination of Oxytetracycline, Tetracycline, Chlorotetracycline and Doxycycline in Bovine Milk and Muscle. *In: Journal of Chromatography A*, 987, pp. 227-233.
- COUTO, C. M. C. M.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; REIS, S. (2000). Complexação da Tetraciclina, da Oxitetraciclina e da Clortetraciclina com o Catião Cobre (II). Estudo Potenciométrico. *In: Química Nova*, 23(4), pp. 457-460.
- FAN, J.; CHEN, Y.; FENG, S.; YE, C.; WANG, J. (2003). Flow-injection spectrophotometric determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in Pharmaceuticals and urine. *In: Analytical Sciences*, 19, pp. 419-422.

- FURUSAWA, N. (1999). Rapid Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline in Milk. *In: Journal of Chromatography A*, 839, pp. 247-251.
- JEVINOVA, P.; DUDRIKOVA, E.; SOKOL, J.; NAGY, J.; MATE, D.; PIPOVA, M.; CABADAJ, R. (2003). Determination of Oxytetracycline Residues in Milk With the Use of HPLC Method and Two Microbial Inhibition Assays. *In: Bulletin Veterinary Institute Pulawy*, 47, pp. 211-216.
- JÚNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, A. F.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y. (2006). Determination of chloramphenicol residues in industrialized milk and honey samples using LC-MS/MS. *In: Quimica nova*, 29(3), pp. 586-592.
- MATOS, C.; MOUTINHO, M.; ALMEIDA, C.; PEREIRA, A.; BALCÃO, V.; RIBEIRO, M.; GUIMARÃES, H.; ROCHA, G.; GUERRA, A. (2007). Alterações na composição lipídica do leite materno durante as primeiras dezasseis semanas da amamentação. *In: Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, nº4, pp. 68-78.
- MSAGATI, T. A. M.; NINDI, M. M. (2004). Multiresidue Determination of Sulfonamides in a Variety of Biological Matrices by Supported Liquid Membrane With High Pressure Liquid Chromatography-electrospray Mass Spectrometry Detection. *In: Talanta*, 64, pp. 87-100.
- POPELKA, P.; NAGY, J.; POPELKA, P.; MARCINCÁK, S.; RÓZANSKA, H.; SOKOL, J. (2004). Comparison of sensitivity of various screening assays and liquid chromatography technique for four penicillin residue detection in milk. *In: Bulletin Veterinary Institute*, 48, pp. 273-276.
- RIBONE, M. É.; PAGANI, A. P.; OLIVIERI, A. C. (2001). Simultaneous multivariate spectrophotometric analysis of ear drops containing a ternary mixture of antipyrine, sulfathiazole, and rivanol. *In: Analytical Letters*, 34(12), pp. 2077-2088.
- SANTOS, L.; BARBOSA, J.; CASTILHO, M. C.; RAMOS, F.; RIBERIOS, C. A. F.; SILVEIRA, M. I. N. (2005). Determination of Chloramphenicol Residues in Rainbow Trouts by Gas Chromatography-mass Spectrometry and Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *In: Analytica Chimica Acta*, 528, pp. 249-256.
- TOLENTINO, R. G.; PÉREZ, M. N.; GONZÁLEZ, G. D.; VEGA Y LEÓN, S.; LÓPEZ, M. G.; FLORES, G. P. (2005). Determination of the Presence of 10 Antimicrobial Residues in Mexican Pasteurized Milk. *In: Interiencia*, 30(5), pp. 291-294.
- TUERK, J.; REINDERS, M.; DREYER, D.; KIFFMEIERS, T.; SCHMIDT, K. G.; KUSS, H. M. (2006). Analysis of Antibiotics in Urine and Wipe Samples from Environmental and Biological Monitoring-Comparison of HPLC with UV-Single MS-and tandem MS-Detection. *In: Journal of Chromatography B*, 831, pp. 72-80.
- WANG, J.; LEUNG, D. (2007). Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *In: Interscience*, 21, pp. 3213-3222.
- WANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, L.; DUAN, Z. J. (2006). Kennedy I. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *In: Food Additives and Contaminants*, 23(4), pp. 362-384.