



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS  
EMPREGANDO HPLC-FD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO  
DE RESÍDUOS DE FLUORQUINOLONAS EM ALIMENTOS DE  
ORIGEM ANIMAL**

**Pedro Silveira Quintana**

**Santa Maria – RS, Brasil  
2017**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS  
EMPREGANDO HPLC-FD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO  
DE RESÍDUOS DE FLUORQUINOLONAS EM ALIMENTOS DE  
ORIGEM ANIMAL**

**por**

**Pedro Silveira Quintana**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade  
Federal de Santa Maria como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Química

**Orientador: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes**

**Santa Maria – RS, Brasil**

**10 de julho – 2017**

**Universidade Federal de Santa Maria**

**Centro de Ciências Naturais e Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Curso de Química Bacharelado**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de  
Conclusão de Curso:

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS  
EMPREGANDO HPLC-FD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO  
DE RESÍDUOS DE FLUORQUINOLONAS EM ALIMENTOS DE  
ORIGEM ANIMAL**

Elaborado por **Pedro Silveira Quintana**, como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Osmar Damian Prestes** (Orientador/UFSM)

---

**Dra. Tiele Medianeira Rizzetti**

**Santa Maria, 10 de julho de 2017**

## **RESUMO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
Departamento de Química – Curso de Química Bacharelado  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGANDO HPLC-FD E LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE FLUORQUINOLONAS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL.**

AUTOR: PEDRO SILVEIRA QUINTANA  
ORIENTADOR: PROF. DR. OSMAR DAMIAN PRESTES  
Data e Local: Santa Maria, 10 de julho de 2017

O agronegócio é um setor de alta produção na indústria Brasileira. Com o objetivo de assegurar a competitividade nesse setor, é bastante comum a utilização de medicamentos veterinários. No entanto, a vasta utilização desses compostos não traz apenas benefícios, apresenta também riscos para a saúde dos animais e da população que consome os produtos dessa indústria. As fluoroquinolonas são uma classe de compostos derivados do ácido nalidixílico. São antibióticos que agem inibindo a reprodução do DNA bacteriano. As fluoroquinolonas possuem alta toxicidade devido à presença de flúor em sua estrutura, podendo causar danos ao sistema nervoso central. Sendo assim, é de extrema importância haver um controle sobre o uso dessas substâncias e um constante monitoramento dos resíduos de medicamentos que permanecem nos produtos derivados de animais. Nesse sentido, a determinação analítica de substâncias em diversas matrizes ganha importância. Uma das principais técnicas para essa determinação é a cromatografia, presente em milhares de laboratórios de todo o mundo. A cromatografia é uma técnica de separação de compostos que, acoplada a um detector, permite realizar a determinação simultânea de diversos analitos em apenas uma amostra. É comumente descrita como uma coluna contendo uma fase estacionária, por onde passa uma fase móvel carregando os analitos. Estes, por possuírem interações específicas com a fase estacionária, eluem por ela com diferentes velocidades, sendo assim realizada a separação cromatográfica. A detecção por fluorescência tem como característica, determinar a presença de compostos medindo a sua emissão fluorescente em um comprimento de onda específico. Foram avaliados diferentes parâmetros para otimizar a separação e detecção de oito compostos

da classe das fluoroquinolonas em sistema HPLC-FD. Diferentes fases móveis e estacionárias foram testadas, além de variações nos comprimentos de onda de excitação e emissão. Além disso, foram avaliadas diferentes condições de detecção para esses compostos em sistema LC-MS/MS, obtendo-se os íons precursores e produtos através da infusão de soluções individuais de  $1\text{mg.L}^{-1}$ .

## **ABSTRACT**

Conclusion of Course Work  
Department of Chemistry – Bachelor Course in Chemistry  
Federal University of Santa Maria

### **EVALUATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS USING HPLC-FD AND LC-MS/MS TO DETERMINE FLUOROQUINOLONES RESIDUES IN FOODS OF ANIMAL ORIGIN**

AUTHOR: PEDRO SILVEIRA QUINTANA  
ORIENTADOR: PROF. DR. OSMAR DAMIAN PRESTES  
Date and Local: Santa Maria, 10<sup>th</sup> July 2017

Agribusiness is a sector of high productivity in Brazilian industry. As to assure competitiveness, it is very common the use of veterinarian drugs in this sector. But the wide usage of these compounds brings not only benefits, but also risks to animal and human health. Fluoroquinolones are a class of compounds derived from nalidixic acid. They are antibiotics that act inhibiting bacterial DNA duplication. Fluoroquinolones are highly toxic due to the presence of fluorine in their structure, being able to cause damage to central nervous system. So it is extremely important to control the use of these substances, and monitor constantly the residues of veterinarian drugs that remain in the derivative of animal products. The analytical determination of substances in various matrices gains importance in that way. One of the main techniques for this determination is chromatography, present in thousands of laboratories in the world. Chromatography is a separation technique that, coupled to a detector, allows to determine simultaneously many analytes in one sample. It is commonly described as a column containing a stationary phase, by which a mobile phase passes through carrying the analytes. Those, for having specific interactions with the stationary phase, elute with different speeds, and this is how the separation happens. Fluorescence detection determines the presence of compounds by measuring their fluorescent emission in a specific wavelength. Different parameters were evaluated to optimize the separation and detection of eight fluoroquinolones in HPLC-FD system. Different mobile and stationary phases were tested, and different excitation and emission wavelengths were also tested. In addition to that, different detection conditions to these compounds were evaluated in LC-MS/MS system, obtaining precursor and product ions through infusing individual solutions at 1 mg.L<sup>-1</sup> concentration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatograma para os nove compostos da classe das fluoroquinolonas.....	28
Figura 2 - Representação estrutural do composto Danofloxacino .....	29
Figura 3 - Representação estrutural do composto Difloxacino .....	29
Figura 4 - Representação estrutural do composto Enrofloxacino .....	30
Figura 5 - Representação estrutural do composto Norfloxacino .....	30
Figura 6 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido ortofosfórico .....	32
Figura 7 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido cítrico .....	33
Figura 8 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido fórmico .....	34
Figura 9 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido fórmico .....	35
Figura 10 - Cromatograma da solução de trabalho contendo os quatro analitos selecionados em concentração $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ .....	36
Figura 11 - Cromatograma obtido com o fluxo de $0.75 \text{ mL.min}^{-1}$ .....	38
Figura 12 - Cromatograma obtido com a coluna Coluna KINETEX® Allcrom EVO C18 100A.....	39
Figura 13 – Cromatograma de uma solução padrão ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em acetonitrila obtido no modo SRM por LC-MS/MS. ....	41
Figura 14 - Cromatogramas das transições monitoradas para cada composto. ....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes mais comuns de antibióticos e mecanismo de ação. Adaptado de GUIMARÃES et al. (2010).....	13
Tabela 2 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida.....	23
Tabela 3 - Programa de gradiente utilizado.....	31
Tabela 4 - Programa de gradiente utilizado.....	35
Tabela 5 - Gradiente de eluição .....	36
Tabela 6 - Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS. ....	39
Tabela 7 - Transições SRM utilizadas na determinação das fluoroquinolonas no sistema LC-MS/MS, massa molar (MM), modo de ionização (ESI +), razões massa/carga (m/z) utilizadas para os íons precursor e produto, energia do cone (V) e energia de colisão (eV).....	40

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVOS .....	11
2.1. Objetivos específicos .....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
3.1. Medicamentos Veterinários .....	11
3.1.1. Fluoroquinolonas .....	13
3.1.2. Resíduos de medicamentos veterinários .....	14
3.1.3. Planos de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários .....	16
3.1.4. Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil .....	17
3.1.5. Determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida .....	18
3.1.6. Cromatografia líquida com detecção de fluorescência .....	19
3.1.7. Espectrofotometria de massas .....	20
3.2. Validação .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
4.1. Instrumentação .....	23
4.2. Reagentes, solventes e materiais utilizados .....	24
4.3. Antibióticos selecionados .....	25
4.4. Preparo das soluções analíticas .....	25
4.5. Otimização sistema cromatográfico HPLC-FD .....	25
4.5.1. Escolha da fase móvel .....	26
4.5.2. Escolha da coluna de separação cromatográfica .....	26
4.5.3. Condições do sistema de detecção .....	26
4.6. Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS .....	26
4.6.1. Escolha da fase móvel .....	27
4.6.2. Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS .....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1. Condições do sistema de detecção .....	28
5.2. Seleção dos analitos .....	28
5.3. Análise dos solventes .....	30
5.4. Condições cromatográficas para o sistema HPLC-FD .....	34
6. CONCLUSÃO .....	42
7. PERSPECTIVAS .....	43

# 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio. A fim de assegurar a produtividade e competitividade do setor, a utilização de medicamentos veterinários com fins terapêuticos e profiláticos é uma prática bastante comum. Dos fármacos utilizados, a classe dos antibióticos representa grande parcela (Thiele-Bruhn, 2003).

O uso de medicamentos veterinários em animais pode deixar resíduos nos alimentos por eles produzidos, como carne, leite e ovos, cujos níveis não devem ultrapassar o Limite Máximo de Resíduos (LMR). O LMR é a concentração máxima de resíduos provinda de medicamentos veterinários (expresso em mg kg<sup>-1</sup> ou µg kg<sup>-1</sup>, em peso fresco) permitida em alimentos de origem animal. O Brasil não estabelece LMR para medicamentos veterinários, adotando aqueles recomendados pelo Mercosul, Codex Alimentarius, União Européia ou Estados Unidos.<sup>1</sup>

Os órgãos regulamentadores e de pesquisa têm dado atenção especial aos riscos à saúde humana representados pela exposição direta aos resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal, considerando-se para isso os valores de Ingestões Diárias Aceitáveis (IDAs) e LMRs estabelecidos para esses produtos (Palermo-Neto, 2005, 2007; Palermo-Neto & Almeida, 2006). Entretanto, as possíveis implicações à saúde humana da exposição indireta a resíduos de antibióticos, via ambiente, ainda são pouco conhecidas (Capleton et al., 2006).

As fluoroquinolonas são antibióticos derivados do ácido nalidixílico, que agem inibindo a replicação do DNA bacteriano. Por ter um átomo de flúor em sua estrutura, esses compostos podem penetrar a barreira hematoencefálica, podendo causar danos no sistema nervoso central. A exposição a antibióticos pode provocar o desenvolvimento de microrganismos resistentes, o que dificulta a ação terapêutica destes medicamentos em indivíduos que consumiram alimentos de animais tratados.<sup>2, 3</sup>

---

<sup>1</sup> Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Relatório PAMVet, 2009. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

<sup>2</sup> Witte. W.; Science 1998, 279, 996.

<sup>3</sup> World Health Organization (WHO). 1994. Disponível em [http://whqlibdoc.who.int/hq/1995/who\\_cds\\_bvi\\_95.7.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1995/who_cds_bvi_95.7.pdf), acessada em junho de 2017

Os diversos métodos de separação cromatográfica têm sido aplicados em diferentes de laboratórios para elucidar os complexos problemas da química, bioquímica, ciências ambientais, toxicologia entre outros, tanto no nível acadêmico como nas aplicações industriais.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar diferentes métodos cromatográficos empregando HPLC-FD e LC-MS/MS para posterior determinação de resíduos de fluorquinolonas em alimentos de origem animal.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da composição de diferentes fases móveis nos sistemas de HPLC-FD e LC-MS/MS;
- Avaliar as melhores condições cromatográficas para a separação eficiente de fluoroquinolonas;
- Definir as melhores condições de detecção para a determinação por fluorescência, testando diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão;
- Definir as melhores condições de detecção para a determinação por espectrometria de massas, avaliando o método de ionização por eletronebulização e o modo de monitoramento de reação selecionada;

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Medicamentos Veterinários**

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os medicamentos veterinários como toda e qualquer substância aplicada, em qualquer animal destinado à produção de alimentos, com fins terapêuticos,

profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento (ANVISA, 2010).<sup>4</sup>

Na pecuária moderna, os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças. Além disso, agentes promotores de crescimento são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que é considerado uma prática abusiva no uso desses medicamentos (STOLKER & BRINKMAN, 2005).<sup>5</sup>

É evidente que há benefícios importantes para os pecuaristas ao usar estas substâncias. Geralmente, o uso desses medicamentos melhora a absorção e a conversão dos alimentos no animal, levando a um ganho em proteínas e sais minerais, estimulando seu crescimento. No entanto, apesar de produzirem benefícios para a pecuária, o uso de medicamentos veterinários pode gerar resíduos destas substâncias nos produtos derivados, como carnes e ovos.

Os antibióticos estão entre os fármacos mais prescritos na atualidade. Estas substâncias são produzidas por diversas espécies de micro-organismos (bactérias, fungos, entre outros), que suprimem o crescimento de outros micro-organismos. Eles possuem “toxicidade seletiva”, destruindo preferencialmente o parasita invasor, poupando o hospedeiro através das diferenças bioquímicas entre ambos (PENILDON & SILVA, 2006).<sup>6</sup>

O termo antibiótico tem sido utilizado de modo mais restrito para indicar substâncias que atingem bactérias, embora possa ser utilizado em sentido mais amplo contra outros parasitas, tais como protozoários e fungos. Eles podem ser divididos em dois grandes grupos: a) bactericidas que possuem efeito letal e irreversível, b) bacteriostáticos que são substâncias de efeito inibitório à multiplicação bacteriana e reversível.

---

<sup>4</sup> ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) 2010.

<sup>5</sup> STOLKER, A.M.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of chromatography A**, v. 1067, p. 15, 2005

<sup>6</sup> PENILDON & SILVA, **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

### 3.1.1. Fluoroquinolonas

Existem diversas formas de classificar os antibióticos, porém a maneira mais usual, e também mais antiga é a que se baseia na estrutura química e nos mecanismos de ação destas substâncias (GOODMAN & GILMAN, 2006).<sup>7</sup> Essa classificação é apresentada na tabela 1. O presente trabalho irá abordar somente a classe das fluoroquinolonas.

Tabela 1 - Classes mais comuns de antibióticos e mecanismo de ação. Adaptado de GUIMARÃES et al. (2010)

Antibióticos	Alvo		Mecanismo de ação
β-lactâmicos penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas	Enzima transpeptidase		Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptideoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana
β-lactâmicos oxapeninas, sulfoxapeninas	Enzima β-lactamase		Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β-lactâmicos.
Macrolídeos lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol, oxazolidinonas	Subunidade ribossômica	50S	Inibição da síntese protéica bacteriana
Aminoglicosídeos, tetraciclina	Subunidade ribossômica	30S	Inibição da síntese protéica bacteriana.
Glicopeptídeos vancomicina, teicoplanina	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptideoglicano		Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana
Peptídeos não ribossomais bacitracina, gramicidina C, polimixina B	Membrana plasmática		Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana
Lipopepsipeptídeos daptomicina	Membrana plasmática		Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido pipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram positivo.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA		Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase		Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di- hidropteroato sintetase		Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucléicos.

Em 1962 foi identificado o primeiro antibiótico da classe das quinolonas, o ácido nalidixílico. Porém, logo o interesse por esta classe de compostos foi perdido devido ao seu pequeno espectro de ação e a rápida resistência desenvolvida pelos micro-organismos a esses medicamentos. A expansão do uso das quinolonas deu-se apenas após modificações estruturais das moléculas,

<sup>7</sup> GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. MAC GRAW HILL. 11 ed., 2006.

com a introdução de átomos de flúor, dando origem à classe das fluoroquinolonas.

As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos de antibióticos usados no tratamento de infecções bacterianas, pois possuem atividade contra uma gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Seu mecanismo de ação está baseado no bloqueio da replicação e síntese do DNA bacteriano pela inibição da enzima topoisomerase II (DNA-girase) e topoisomerase IV. No primeiro caso, inibindo a transcrição e/ou replicação do DNA e no segundo interferindo na separação do DNA cromossômico replicado (KATZUNG, 2010).<sup>8</sup>

Essa classe de antibióticos já esteve entre os antimicrobianos de eleição para o tratamento de algumas doenças humanas. Porém, desde a década de 1990 tem ocorrido um aumento preocupante na resistência às fluoroquinolonas. Fato que foi atribuído ao uso extensivo destas substâncias na avicultura (PIDDOCK *et al.*, 2003).

Por esse motivo, nos Estados Unidos e no Canadá, o uso dessa classe de fármacos em frangos foi banido após decisão do FDA (*Food and Drug Administration*) (AGUNOS *et al.*, 2012).<sup>9</sup> No Brasil, desde 2009, o uso de fluoroquinolonas foi proibido como promotor de crescimento ou como medicação preventiva, sendo permitido apenas para fins terapêuticos (BRASIL, 2009).<sup>10</sup>

### 3.1.2. Resíduos de medicamentos veterinários

A norma NBR ISO 22000 aborda o sistema de gestão da segurança dos alimentos e define que estes não devem constituir vias de exposição a perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos ou químicos (NBR ISO 22000, 2006).<sup>11</sup> Entre os perigos químicos, destacam-se os

---

<sup>8</sup> KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Tradução: Consendey, C. H. et AL. 10 ed. Porto Alegre. AMGH, 2010. p.692 – 695.

<sup>9</sup> AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 1289-1300, 2012. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500121/pdf/cvj\\_12\\_1289.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500121/pdf/cvj_12_1289.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2017.

<sup>10</sup> BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 26 de 9 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Seção 1, p. 14.

<sup>11</sup> **NBR ISO 22000**. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2006.

resíduos e contaminantes. A segurança dos alimentos destinados ao consumo humano é diretamente afetada pela presença de resíduos de medicamentos veterinários, principalmente aqueles cuja produção é sabidamente dependente do uso de tais insumos, como é a aquicultura. Além de atingir os animais confinados durante o processo de produção, os medicamentos veterinários utilizados ao longo da cadeia produtiva podem atingir animais próximos às instalações aquícolas. Estes animais representam, portanto, riscos à saúde humana visto que estão livres para serem capturados e consumidos (BURRIDGE et al., 2010; CABELLO, 2006; FORTT et al., 2007).<sup>12,13 e 14</sup>

Além disso, a aplicação de antibióticos em grandes quantidades pode afetar a saúde dos trabalhadores aquícolas uma vez que inalação, ingestão ou contato de material particulado ou pulverizado com a pele pode alterar a flora humana normal, selecionar bactérias resistentes aos antibióticos e potencialmente gerar problemas de alergia e toxicidade (BURRIDGE et al., 2010; CABELLO, 2006; FORTT et al., 2007).

Neste mesmo contexto, existe ainda a preocupação com a contaminação ambiental por parte do uso de antibióticos, pois muitos deles são quimicamente estáveis e se mantêm ativos mesmo depois de administrados e excretados no meio ambiente. Os resíduos de medicamentos veterinários aumentam a possibilidade de seleção natural de bactérias resistentes a antibióticos que podem afetar animais e seres humanos. Em geral, quanto mais um antibiótico é usado, maior o risco de emergência e disseminação de resistência contra ele, devido ao aumento da pressão seletiva, tornando a droga cada vez mais inútil. A maior preocupação é o desenvolvimento de patógenos que tenham resistência a todos medicamentos conhecidos, desencadeando epidemias de doenças

---

<sup>12</sup> BURRIDGE, L. et al. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 15 ago. 2010.

<sup>13</sup> CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137–1144, jul. 2006.

<sup>14</sup> FORTT Z, A.; CABELLO C, F.; BUSCHMANN R, A. Residues of tetracycline and quinolones in wild fish living around a salmon aquaculture center in Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 24, n. 1, p. 14–18, fev. 2007.

bacterianas que não podem ser tratadas (BAQUERO et al., 2008; MARTINEZ, 2009; SILBERGELD et al., 2008).<sup>15,16 e 17</sup>

Portanto, regulamentações que limitam o uso de medicamentos veterinários na produção de alimentos de origem animal são estabelecidas por diferentes países. Os regulamentos restringem o uso de tais substâncias porém isto não se reflete em custos elevados de produção, demonstrando compatibilidade com a segurança dos alimentos e os lucros do setor (BURRIDGE et al., 2010).<sup>12</sup> Diferentes países e blocos econômicos como a União Europeia, possuem programas de monitoramento dessas substâncias na cadeia alimentar.

### **3.1.3. Planos de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários**

As deficiências nas boas práticas agropecuárias durante a utilização de medicamentos de uso veterinário incorrem no aparecimento destes resíduos que podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso, tais como: espécie alvo, dosagem, via de administração e período de despesca (DENOILE & NASCIMENTO, 2004).<sup>18</sup>

O Codex Alimentarius, através do Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF) define o termo "resíduo" de medicamento veterinário como a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias. A ocorrência

---

<sup>15</sup> BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, Energy biotechnology / Environmental biotechnology. v. 19, n. 3, p. 260–265, jun. 2008.

<sup>16</sup> MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1667, p. 2521–2530, 22 jul. 2009.

<sup>17</sup> SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 151–169, 2008.

<sup>18</sup> DENOILE, M.; NASCIMENTO, E. DE S. Method validation for the determination of the antibiotics residues oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in milk by high performance liquid chromatography. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209–218, jun. 2004.

dos resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais pode variar de acordo com o tipo de amostra (musculo, fígado, rim, entre outros) escolhida para ser analisada. Esta variabilidade deve-se as diferentes rotas de metabolismo e as interações que ocorrem com o princípio ativo após a administração do medicamento no animal (KINSELLA et al., 2009).<sup>19</sup> Assim, de acordo com o metabolismo e/ou interações do princípio ativo os resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal podem ser classificados como:

Resíduos livres: caracterizam-se pelo princípio ativo administrado e também por seus metabolitos estruturalmente relacionados (epímeros, produtos de oxidação, derivados metilados, entre outros) (KINSELLA et al., 2009).<sup>20</sup>

Resíduos conjugados: são aqueles onde o princípio ativo sofre reações de glicosilação enzimática ou de sulfonação (KINSELLA et al., 2009).<sup>20</sup>

Resíduos ligados: são resultantes da ligação entre o princípio ativo e proteínas ou outras biomoléculas (KINSELLA et al., 2009).<sup>20</sup>

O limite máximo de resíduo de um determinado composto é a quantidade máxima de resíduo aceita oficialmente em um alimento. As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como WHO (World Health Organization) e o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), órgão do Codex Alimentarius, o Food and Drug Administration dos EUA e a Agência Europeia de Medicamentos, estabelecem valores de limite máximo de resíduo. No Brasil, a competência para estabelecer os limites máximos de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

#### **3.1.4. Monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários no Brasil**

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o principal programa de inspeção e fiscalização da produção de alimentos no Brasil. O objetivo do programa é o monitoramento da efetividade dos controles

---

<sup>19</sup> KINSELLA, B. et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Journal of Chromatography A**, Hormones and Veterinary Drugs State-of-the-art and emerging technologies. v. 1216, n. 46, p. 7977–8015, 13 nov. 2009.

de risco, qualidade e segurança implementados em diferentes cadeias produtivas, tanto animal como vegetal. No caso do monitoramento das cadeias produtivas de alimentos de origem animal (aves, pescados, suínos, bovinos e equinos) as amostras são oficiais e coletadas por fiscais federais agropecuários em estabelecimentos de abate e processamento sob a responsabilidade do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (MAPA, 2015).<sup>20</sup>

### **3.1.5. Determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida**

A técnica preferencial para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de alimentos de origem animal é a cromatografia líquida. Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar separação de compostos químicos. Em conjunto com outras técnicas instrumentais, como espectrofotometria ou espectrometria de massas, é possível identificar e quantificar analitos (COLLINS, 2006).<sup>21</sup> Os métodos multiclases estão atualmente ganhando espaço na determinação de resíduos de medicamentos.

O acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas permite a determinação de mais de uma classe de medicamentos simultaneamente, uma vez que mais de uma transição pode ser monitorada enquanto mais de um composto é eluído da coluna, o que não pode ser feito utilizando métodos espectrofotométricos de detecção, por exemplo. Ainda incomuns, estes métodos representam o futuro deste campo, sendo limitados apenas pelo processo de extração, uma vez que é notável a dificuldade de proporcionar recuperações aceitáveis de analitos com distintas propriedades físico-químicas (SANTOS & RAMOS, 2016).<sup>22</sup>

---

<sup>20</sup> MAPA. **RESULTADOS GERAIS DO SUBPROGRAMA DE MONITORAMENTO E SUBPROGRAMA EXPLORATÓRIO DO PLANO NACIONAL DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES – PNCRC 2015**, 2015.

<sup>21</sup> Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. Introdução a métodos cromatográficos, cap I, Campinas, SP : Editora da UNICAMP, 2006

<sup>22</sup> SANTOS, L.; RAMOS, F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. Trends in Food Science & Technology, v. 52, p. 16–30, jun. 2016.

### 3.1.6. Cromatografia líquida com detecção de fluorescência

A técnica de cromatografia líquida se diferencia da cromatografia gasosa pela utilização de fase móvel líquida, na qual os analitos encontram-se solubilizados, e ocorrem interações dos compostos com a fase móvel e com a fase estacionária. Existem diversas variações dentro da cromatografia líquida, o que possibilita uma alta versatilidade na análise de diferentes classes de compostos. Isso faz com que a cromatografia líquida seja, em geral, a opção mais utilizada para separações atualmente (VOGUEL, 2015).<sup>23</sup>

A cromatografia líquida é uma técnica muito importante de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Atualmente, seu emprego é considerado indispensável em vários laboratórios (COLLINS, 2006).<sup>24</sup>

O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia baseia-se na diferença de solubilidade do analito na fase móvel e fase estacionária. Os analitos mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos, enquanto que os que possuem maior interação com a fase móvel serão carregados mais rapidamente pela coluna. Existem diversos detectores para cromatografia líquida, os quais devem ter as seguintes características: detectabilidade e seletividade adequada, ampla faixa linear, resposta rápida, pois detectores lentos formam picos deformados e com cauda longa, boa estabilidade e reprodutibilidade e conservação da amostra, permitindo coletar o eluato.

A escolha do detector adequado varia com o tipo de amostra e os analitos a serem analisados, pois de acordo com suas características, pode-se limitar o uso a certos detectores. Neste trabalho, utilizou-se dois detectores, o detector por fluorescência e o espectrofotômetro de massas.

O princípio de funcionamento dos detectores de fluorescência é que a luz de comprimento de onda adequado passa através da cela de amostra, que é excitada por ela. No retorno ao estado fundamental, a molécula excitada emite luz de comprimento de onda maior, que é detectada a um ângulo reto da radiação incidente.

---

<sup>23</sup> VOGEL, A.I. Análise química quantitativa. 6ed., p.144-158. Rio de Janeiro. LTC, 2015.

<sup>24</sup> Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. Introdução a métodos cromatográficos, cap IX, Campinas, SP : Editora da UNICAMP, 2006

A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção seletivo, sendo o detector de maior detectabilidade para compostos que fluorescem. O detector por fluorescência tem a capacidade de atingir de forma confiável baixos limites de detecção, a nível de picogramas, e é superior aos detectores por absorbância no UV/Vis em relação à sensibilidade, especificidade e seletividade. Uma alta intensidade de fluorescência é esperada para compostos que sejam conjugados simetricamente, ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas. A fluorescência pode ser desenvolvida em compostos não-fluorescentes por reações realizadas pré ou pós coluna (LAI & FRANKE, 2013).<sup>25</sup>

A fase móvel empregada nos detectores por fluorescência deve ser cuidadosamente selecionada, pois a intensidade de emissão de cada composto é dependente do meio em que se encontra.

Neste detector a luz proveniente de uma fonte UV atravessa um sistema óptico, composto de lentes e um monocromador, que focaliza o feixe e seleciona o comprimento de onda para excitar a amostra. Quando um composto fluorescente está presente, é emitido luz em um comprimento de onda maior, uma outra lente coleta a energia fluorescente e focaliza-a, passando novamente por monocromador, até chegar na fotomultiplicadora, que mede a intensidade da radiação (COLLINS,2006).<sup>15</sup> Os detectores de fluorescência, por possuírem uma fonte de luz UV, podem ser combinados para atuarem como detector de absorbância no UV.

### **3.1.7. Espectrofotometria de massas**

O princípio básico da espectrometria de massas consiste na geração de íons a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos e separação de acordo com a sua razão massa-carga ( $m/z$ ), seguida de detecção qualitativa e quantitativa da respectiva razão  $m/z$  e abundância. O analito pode ser ionizado termicamente, por campos elétricos ou por impacto de elétrons, íons ou fótons.

---

<sup>25</sup> LAI, J.F.; FRANKE, A. A. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments. **Journal of Chromatography B**, 931, p. 23–41, 2013.

O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector (GROSS, 2004).

As fontes de ionização mais comumente utilizadas em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) são a ionização química a pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletronebulização (ESI). Neste trabalho será dado enfoque à fonte ESI, pois esta foi a fonte de ionização utilizada.

Na ionização por ESI, o analito de interesse se encontra dissolvido na fase móvel, e esta passa através de um capilar mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar, é formado um “spray”, este é constituído por pequenas gotas altamente carregadas que sofrem dessolvatação em fluxo constante de nitrogênio gasoso.

Durante o processo de dessolvatação, as gotas são reduzidas até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas dos analitos se torna maior do que a força de coesão da fase líquida, ocasionando a chamada “explosão coulômbica”, gerando gotas cada vez menores, por fim produzindo íons dos analitos, que são levados para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).<sup>26</sup>

A espectrometria de massas em série mostra uma detectabilidade e uma seletividade superior em níveis traços em matrizes complexas. Esta técnica promove uma eliminação de interferências de background, aumentando assim, a razão sinal/ruído e também a seletividade. A confirmação dos compostos é obtida com alto grau de certeza, devido à especificidade de cada composto em relação ao seu espectro de massas.

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (SRM do inglês “*selected reaction monitoring*”) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e fragmentados novamente. É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001).<sup>27</sup> O MRM aumenta a seletividade da espectrometria de massas e melhora a detectabilidade, diminuindo a interferência e o ruído.

---

<sup>26</sup> CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.31, p. 623-636, 2008.

<sup>27</sup> VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227, 2001

O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) é formado pela junção de três quadrupolos em sequência, dois analisadores com uma cela de colisão entre eles. No primeiro quadrupolo, o íon é selecionado e separado da corrente de íons vinda da fonte. No segundo, este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de argônio. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos fragmentos até o detector (HARRIS, 2001).<sup>28</sup>

### 3.2. Validação

Para garantir a confiabilidade dos resultados produzidos por um determinado método analítico ele deve ser submetido a uma série de parâmetros que possam garantir sua eficácia, esse processo chama-se validação. A validação de métodos analíticos consiste num processo de verificação que demonstra se o método escolhido atende aos objetivos desejados (ANVISA, 2007).<sup>29</sup>

Não existe uma unificação quanto a validação de métodos analíticos, porém, diversos órgãos regulamentados como o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), a Agência de vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Internacional de Padronização (ISO) tem estabelecidos alguns parâmetros que devem ser obedecidos para a validação. De acordo com a ANVISA (2003), os padrões mais comumente utilizados para validação são: especificidade, seletividade, linearidade, curva de calibração, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003).<sup>30</sup> Alguns dos parâmetros avaliados durante a etapa de validação estão representados na Tabela 2.

---

<sup>28</sup> HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC editora, p. 640-645, 2001.

<sup>29</sup> ANVISA. Guia para o Controle da Qualidade para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos para os laboratórios integrantes do PARA. 2007.

<sup>30</sup> ANVISA. **Guia Para Validação De Métodos Analíticos E Bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários por cromatografia líquida

Parâmetro	Referência	Definição	Aplicação
Seletividade	INMETRO	Distinção de resposta entre analitos,	Extração de matriz "branco"
	ANVISA	Distinção da resposta do analito na presença de interferentes,	
Especificidade	EU CD/657/02		
Linearidade	INMETRO ANVISA	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica (y = ax + b)
Faixa Linear de trabalho	INMETRO ANVISA	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica (y = ax + b)
Efeito Matriz	Gosetti, 2010	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco
Limite de detecção	INMETRO ANVISA	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3
Limite de quantificação			S/R = 10
Limite de decisão	EU CD/657/02	Limite de concentração passível de decisão/confirmação com propabilidade de erro $\alpha/\beta$	$CC\alpha = (Ref) + 1,64(\text{Desvio padrão})$
Capacidade de detecção			$CC\beta = CC\alpha + 1,64(\text{Desvio padrão})$
Precisão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetitividade e Reprodutibilidade
Exatidão	INMETRO ANVISA	Proximidade de resultado em relação à uma referência	Ensaio de fortificação

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na otimização das condições cromatográficas e de detecção para a determinação de fluoroquinolonas em HPLC-FD.

### 4.1. Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- Sistema HPLC-FD Perkin Elmer (Shelton, USA) contendo: Bomba quaternária *series 200*; Detector de fluorescência *series 200a*; Degaseificador *series 200* e Amostrador automático *autosampler series 225*, Interface NCI 900 e sistema de aquisição de dados Perkin Elmer (Shelton, USA) TotalChrom 3.0);
- Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido Varian 320-MS, equipado com: Detector MS, 320-MS triplo quadrupolo (TQ) Mass Spectrometer com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (Varian, EUA); Amostrador automático ProStar 410, bomba quaternária 212-LC, forno para coluna e sistema de degaseificação (Varian, EUA); Sistema de aquisição de dados através do Software MS Workstation Version 6.9.2 (Varian, EUA);
- Coluna analítica Pursuit XRs Ultra C18 100 × 2.0 mm (i.d.) e 2.8 µm tamanho de partícula
- Coluna Acclaim™ 120 C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. x 5 µm)
- Coluna KINETEX® Allcrom EVO C18 100A, (250 mm x 4,6mm d.i. x 5 µm);
- Sistema de purificação de água Mili-Q – resistividade 18,2 M r cm, Direct-Q 3UV, modelo ZRQSVPO30;
- Balança analítica de precisão com quatro casas decimais Shimadzu, modelo UX 420 H;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá)

## 4.2. Reagentes, solventes e materiais utilizados

### Solventes e reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA)
- Ácido Cítrico
- Ácido Fórmico
- Ácido Nítrico
- Ácido orto-fosfórico

## **Materiais**

- Béqueres
- Frascos de 2mL (vials)
- Provetas

### **4.3. Antibióticos selecionados**

No desenvolvimento desse método foram selecionados oito antibióticos: ácido nalidixílico, ácido oxolínico, ciprofloxacino, danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino, norfloxacino e ofloxacino.

Estes compostos foram selecionados de acordo com a disponibilidade dos padrões sólidos em estoque no laboratório.

### **4.4. Preparo das soluções analíticas**

Para o preparo das soluções analíticas estoques, efetuou-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão sólido a ser pesado, para obter soluções individuais de cada composto, na concentração de 1000 mg mL<sup>-1</sup>.

Prepararam-se individualmente, 10 mL da solução estoque 1000 mg mL<sup>-1</sup> de cada medicamento veterinário, considerado a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que 4 °C.

A partir destas soluções, preparou-se 5mL de uma mistura na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> pela adição de 50µL de cada solução individual em um balão volumétrico, e completando o volume com uma solução de acetonitrila com 0,01 M de ácido nítrico.

### **4.5. Otimização sistema cromatográfico HPLC-FD**

Neste trabalho, as análises foram realizadas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector por fluorescência (HPLC-FD). A seguir, estão descritos os principais parâmetros do sistema cromatográfico HPLC-FD que foram otimizados para a determinação dos compostos em estudo.

#### **4.5.1. Escolha da fase móvel**

A escolha da fase móvel foi realizada através de informações obtidas por meio de revisão bibliográfica sobre o assunto. Foram testadas três diferentes fases aquosas acidificadas com diferentes ácidos, mantendo a mesma fase orgânica.

As fases aquosas testadas foram acidificadas com ácido ortofosfórico, ácido cítrico e ácido fosfórico.

O ajuste de gradiente foi realizado por meio de injeções de soluções contendo todos os padrões, até otimizar o método.

#### **4.5.2. Escolha da coluna de separação cromatográfica**

Foram utilizadas duas colunas durante os testes, ambas de mesma fase estacionária, com dimensões de comprimento, diâmetro interno e tamanho de partícula iguais, apenas modificando a porosidade da coluna. São elas coluna Acclaim™ 120 C18 (250 mm x 4,6 mm d.i. x 5 µm) e coluna KINETEX® Allcrom EVO C18 100A, (250 mm x 4,6mm d.i. x 5 µm). A segunda apresenta porosidade de 100A, enquanto que a primeira apresenta a porosidade maior, de 120A.

#### **4.5.3. Condições do sistema de detecção**

A fim de obter as condições ótimas de análise, adequou-se alguns parâmetros de detecção do instrumento. O detector por fluorescência pode selecionar diferentes comprimentos de onda para excitação e para emissão.

Foram feitos testes variando-se o comprimento de onda de emissão para os compostos, pois conforme descrito na literatura, o comprimento de onda de excitação ótimo é de 278 nm.

### **4.6. Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS**

Neste trabalho, as análises foram realizadas empregando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). Este sistema apresenta maior detectabilidade e seletividade em relação aos sistemas

acoplados a detectores convencionais. Além disso, o LC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e minimizar o problema de co-eluição de substâncias encontradas, sendo o detector de massas uma ferramenta analítica essencial para a análise e confirmação dos analitos de interesse em níveis de traços. A seguir, estão descritos os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS que foram otimizados para a determinação dos compostos em estudo.

#### **4.6.1. Escolha da fase móvel**

A escolha da fase móvel foi realizada através de testes baseados nas informações contidas na literatura. Foram testados três diferentes fases orgânicas com a mesma fase aquosa acidificada com ácido fórmico até pH 3.

As fases orgânicas testadas foram metanol acidificado com ácido fórmico, acetonitrila acidificada com ácido fórmico e acetonitrila pura.

O ajuste de gradiente foi realizado por meio de injeções de soluções contendo todos os padrões, até otimizar o método.

#### **4.6.2. Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS**

A fim de obterem as condições ótimas de análise de cada um dos compostos em estudo, foram realizadas injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de cada composto individualmente. A partir das infusões, foi selecionado o modo de ionização da fonte, voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

Após a otimização destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação dos compostos estudados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Condições do sistema de detecção FD

As condições do sistema de detecção foram selecionados baseados na literatura. O comprimento de onda de excitação comumente utilizado na literatura varia entre 260 e 270 nm para estes compostos. O comprimento de onda de emissão varia entre 400 e 460 nm. Assim, foram feitos dois testes, e foi verificada uma maior intensidade de sinal em 446 nm.

### 5.2. Seleção dos analitos

Foram selecionados oito compostos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas, de acordo com a disponibilidade no laboratório. Foram realizados testes com os padrões individuais de cada composto na concentração de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Utilizando-se do programa de gradiente descrito na literatura <sup>28</sup>, obteve-se o seguinte cromatograma para os oito compostos:

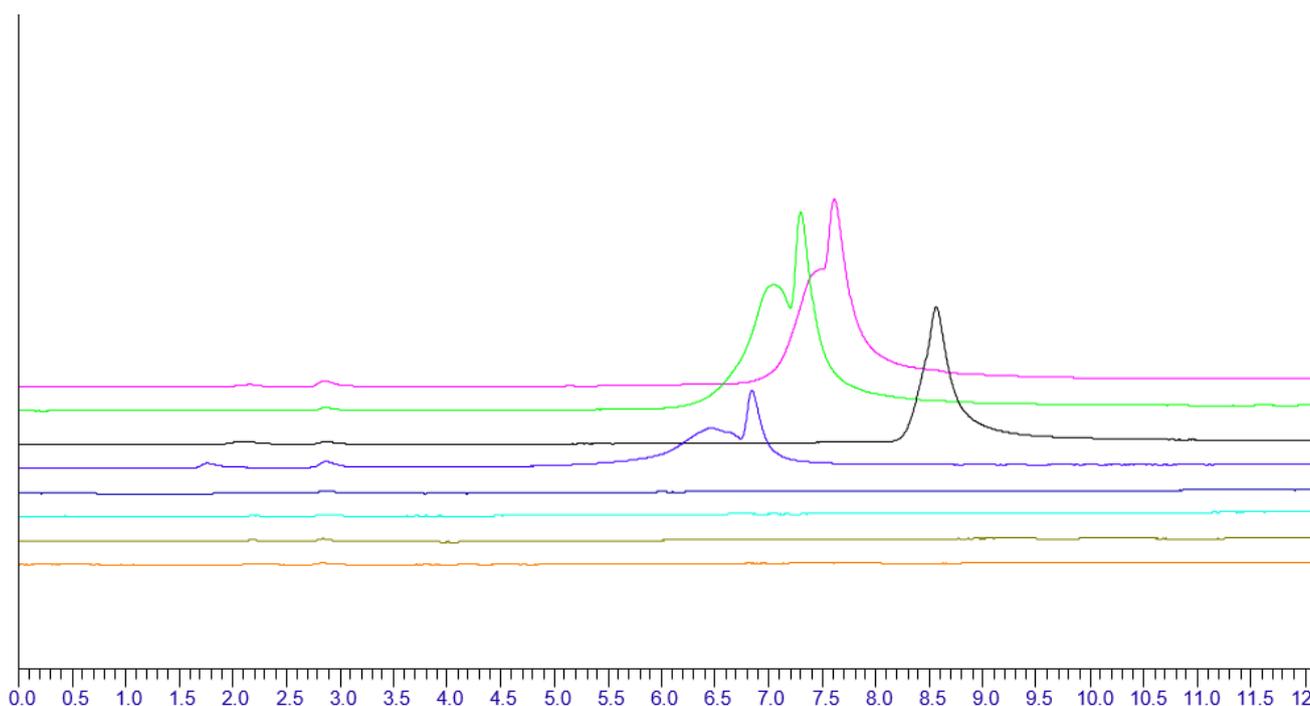
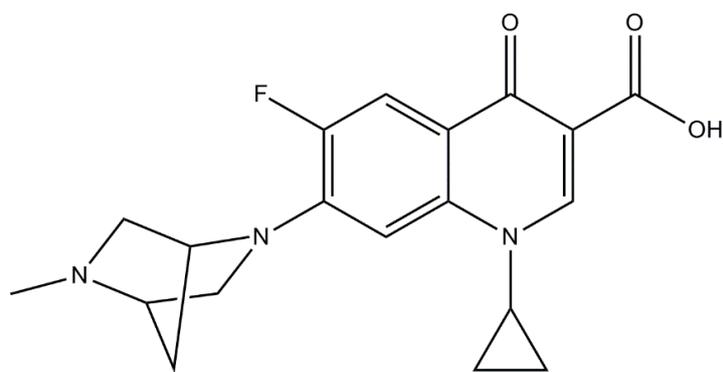


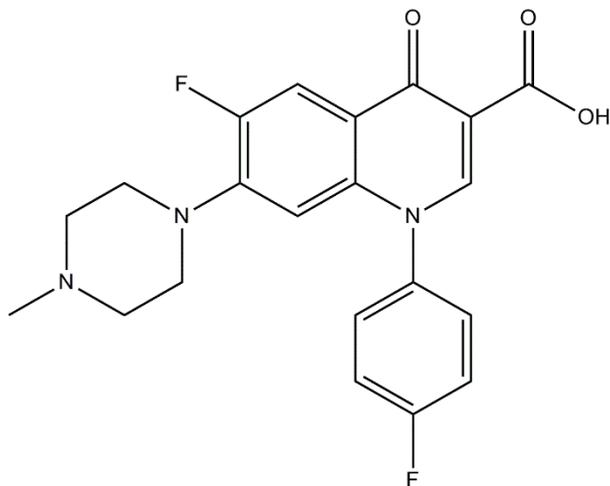
Figura 1 - Cromatograma para os oito compostos da classe das fluoroquinolonas

Como é possível observar, apenas quatro compostos apresentaram sinal cromatográfico no equipamento, nos parâmetros utilizados. Foram eles: danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino e norfloxacino, com suas estruturas demonstradas abaixo.



Danofloxacino

Figura 2 - Representação estrutural do composto Danofloxacino



Difloxacino

Figura 3 - Representação estrutural do composto Difloxacino

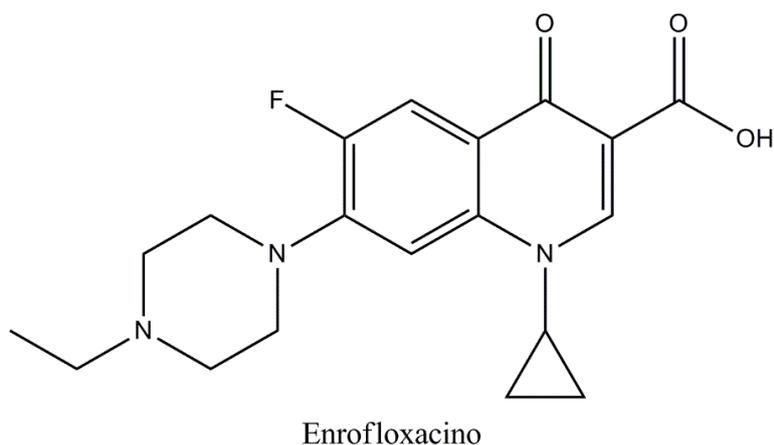


Figura 4 - Representação estrutural do composto Enrofloxacin

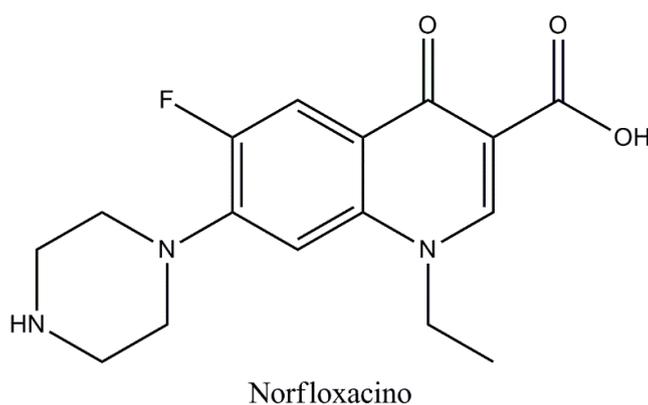


Figura 5 - Representação estrutural do composto Norfloxacin

### 5.3. Análise dos solventes no sistema de detecção por FD

Em cromatografia líquida, a escolha das fases móveis para a eluição é uma etapa fundamental. Geralmente, a eluição é feita com uma fase móvel aquosa e uma fase orgânica. Como solvente aquoso, foi utilizado água acidificada. Como solvente orgânico, foi utilizado acetonitrila. A fase aquosa foi testada com três diferentes ácidos, com injeções dos padrões individuais na concentração de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Os primeiros testes foram conduzidos no equipamento HPLC-FD com comprimento de onda de excitação de 278 nm e comprimento de onda de

emissão de 446 nm. A fase orgânica era acetonitrila pura, e a fase aquosa continha 25 mM de ácido ortofosfórico. Esse teste foi baseado na literatura.<sup>31</sup>

Tabela 3 - Programa de gradiente utilizado

<b>Tempo (min)</b>	<b>Acetonitrila (%)</b>	<b>Água 25 mM</b>
		<b>ác. ortofosfórico (%)</b>
0,5	13	87
10	20	80
4	40	60
6	40	60
1	20	80
1	13	87
8	13	87

Com o gradiente mostrado na tabela 3, foi obtido o cromatograma exibido na figura 6.

<sup>31</sup> GALARINI, R. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultravioleta absorbance detection, **Journal of chromatography A**, 2009, v. 1216, p 8158-8164

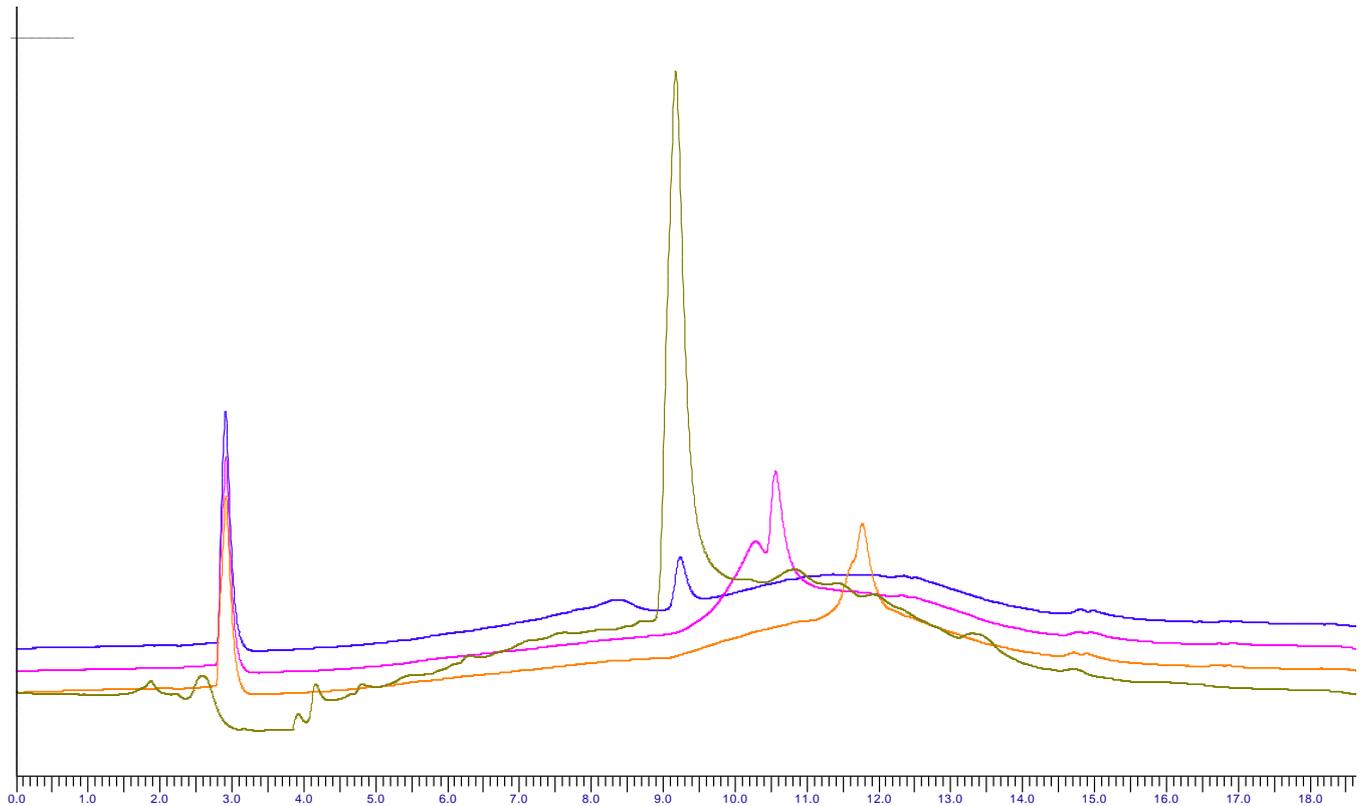


Figura 6 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido ortofosfórico

A imagem acima exibe os cromatogramas dos quatro compostos selecionados. Como é possível identificar, os cromatogramas apresentaram uma elevação na linha base no tempo de retenção próximo ao tempo de retenção dos analitos.

Foi então testada a fase móvel acidificada com ácido cítrico em pH=3 com o mesmo gradiente, e obteve-se o seguinte cromatograma

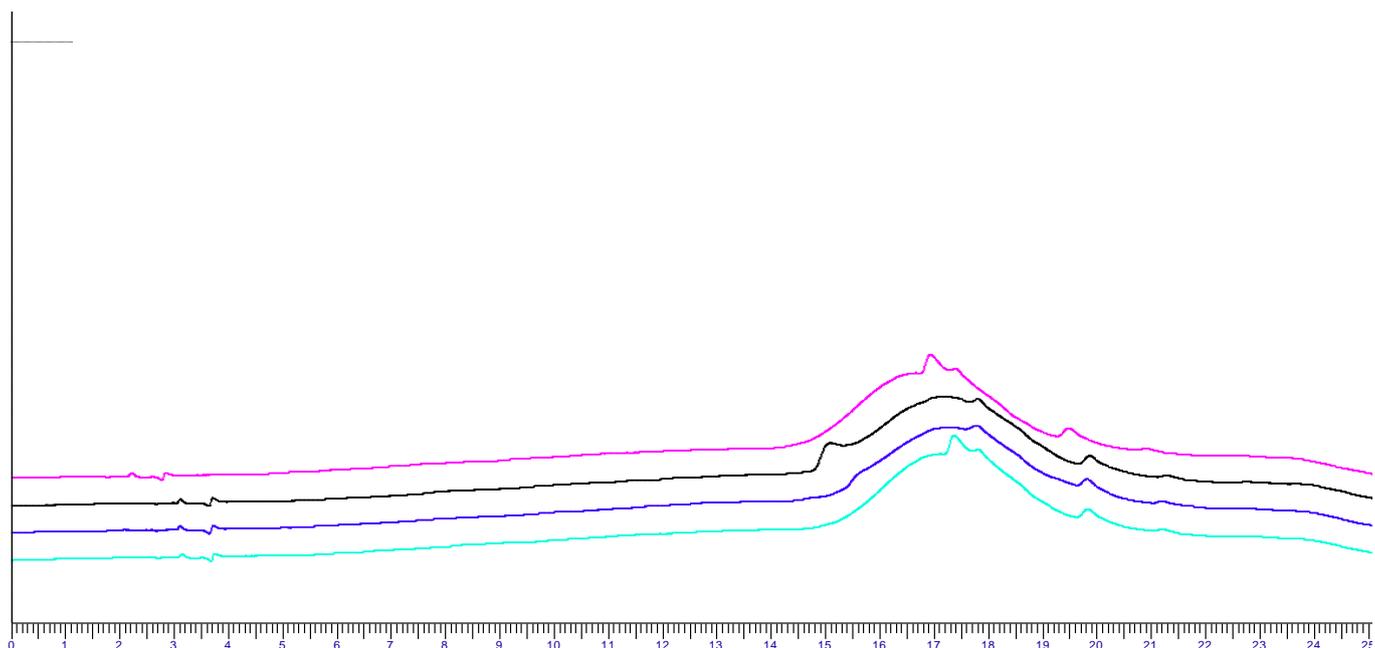


Figura 7 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido cítrico

Com esta fase móvel não foi possível identificar os picos cromatográficos dos analitos, devido à baixa razão sinal/ruído. A seguir foi testado a fase móvel aquosa com ácido fórmico, no mesmo programa de gradiente, conforme exibido no cromatograma abaixo.

Percebeu-se que a variação no aditivo da fase aquosa interferia significativamente na linha base dos cromatogramas. Por isso, escolheu-se o ácido fórmico como aditivo à fase móvel.

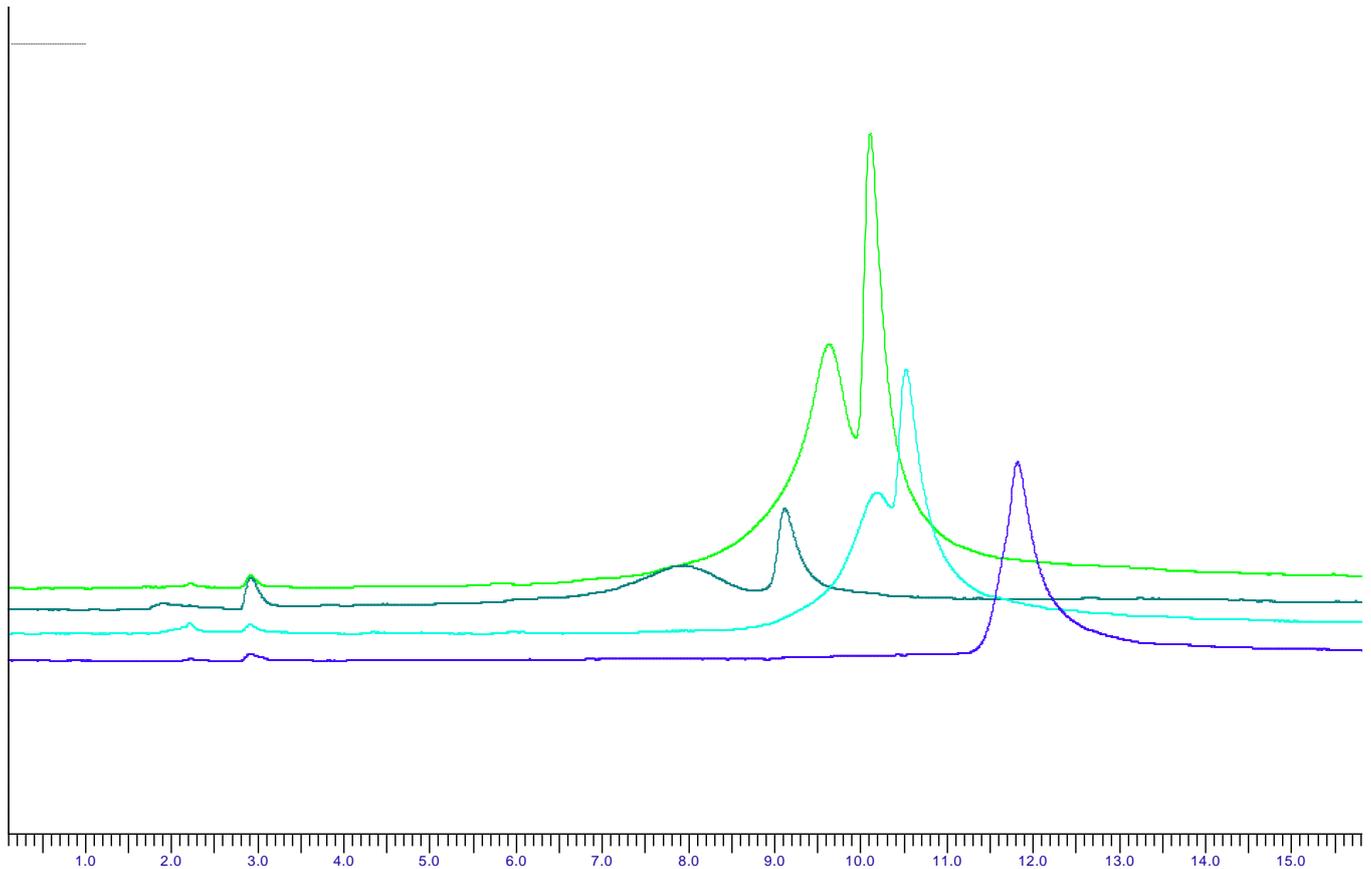


Figura 8 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido fórmico

O cromatograma exibido acima é dos mesmos quatro compostos. Dessa vez a linha base manteve-se baixa durante toda a corrida, o que possibilitou a determinação das áreas dos picos cromatográficos destes compostos.

#### **5.4. Condições cromatográficas para o sistema HPLC-FD**

Partiu-se então para a otimização do gradiente de eluição, para efetuar separação cromatográfica. Por meio da injeção dos quatro compostos separadamente.

Foi testado um gradiente diminuindo o tempo em que se aumenta a vazão de fase orgânica, conforme tabela abaixo

Tabela 4 - Programa de gradiente utilizado

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água 25 mM	
		ác. ortofosfórico (%)	
0,5	13	87	
5	20	80	
4	40	60	
6	40	60	
1	20	80	
1	13	87	
6	13	87	

Com o gradiente apresentado na tabela 4, foi possível reduzir o tempo de retenção dos compostos, como apresentado no cromatograma na figura 9.

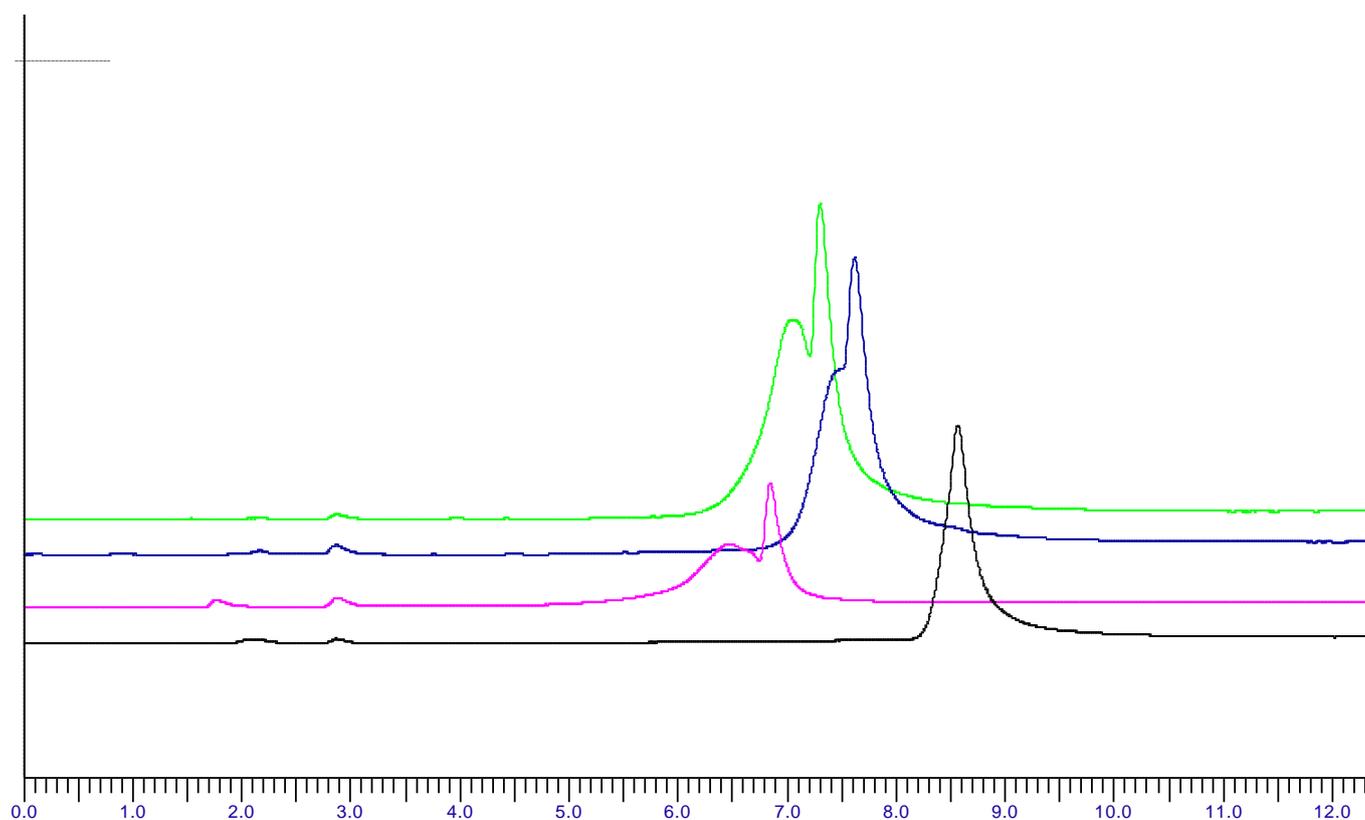


Figura 9 - Cromatograma para 4 compostos com fase móvel aquosa acidificada com ácido fórmico

Todos os testes seguintes foram realizados com a injeção de uma solução de trabalho contendo todos os analitos na concentração de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ . A primeira injeção foi realizada com o gradiente conforme descrito na tabela 4, obtendo-se o seguinte cromatograma.

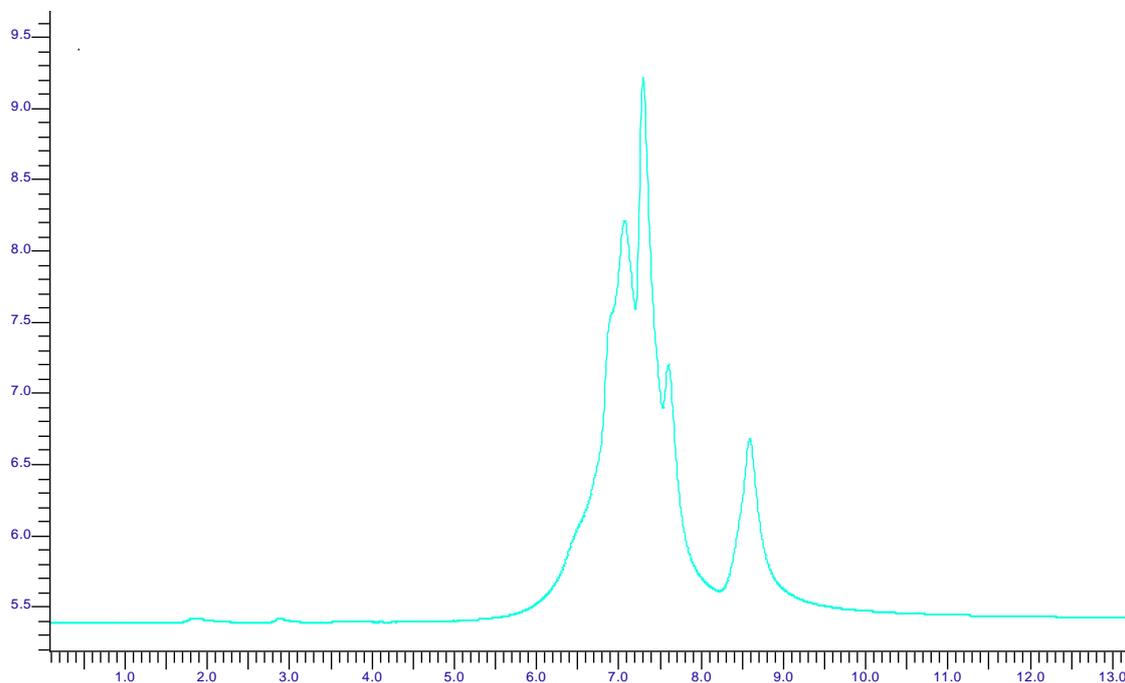


Figura 10 - Cromatograma da solução de trabalho contendo os quatro analitos selecionados em concentração  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$

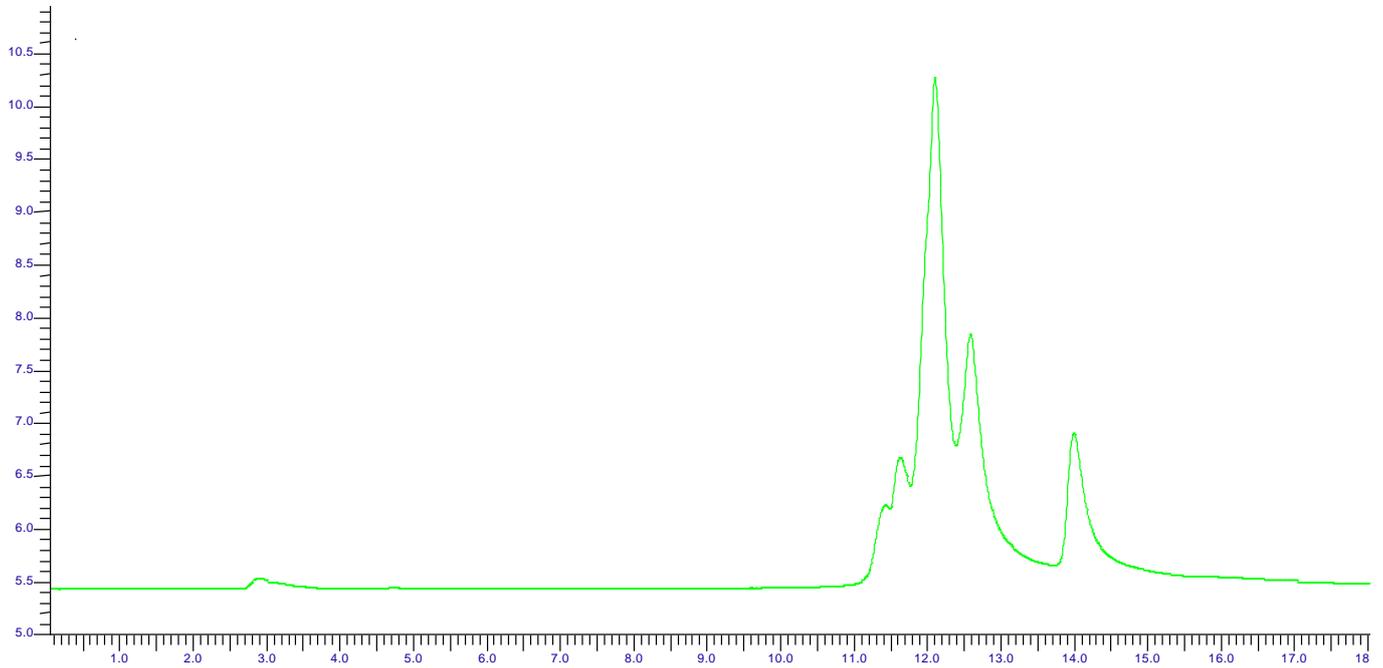
Devido à separação insatisfatória, tentou-se adequar o gradiente de eluição para melhor separação dos picos.

Tabela 5 - Gradiente de eluição

Tempo (min)	Água 25 mM	
	Acetonitrila (%)	ác. ortofosfórico (%)
0,5	13	87
1	13	87
8	50	50

6	50	50
4	13	87
4	13	87

---



Ainda assim não foi possível realizar separação eficiente dos compostos. Foi testado o gradiente anterior, apenas reduzindo o fluxo dos solventes para  $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Com isso, obteve-se o gradiente abaixo.

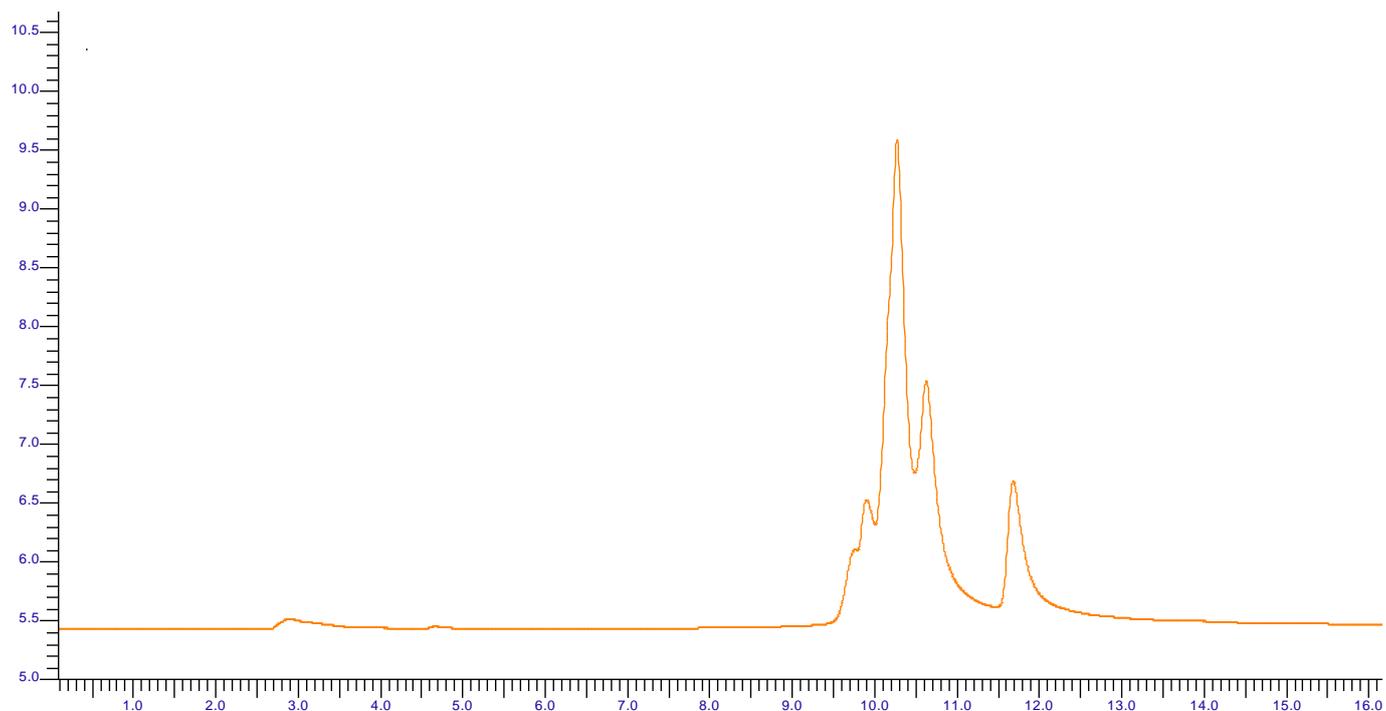


Figura 11 - Cromatograma obtido com o fluxo de  $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Pode-se verificar que ao reduzir a taxa de fluxo dos solventes, apenas ocorreu uma mudança no tempo de retenção dos analitos, não foi verificada modificação na separação dos picos.

Foi então realizada a eluição da solução de trabalho em uma nova coluna cromatográfica, nas mesmas condições de análise. A coluna utilizada possui uma porosidade menor em relação à anterior, o que proporcionou uma melhor separação dos picos cromatográficos.

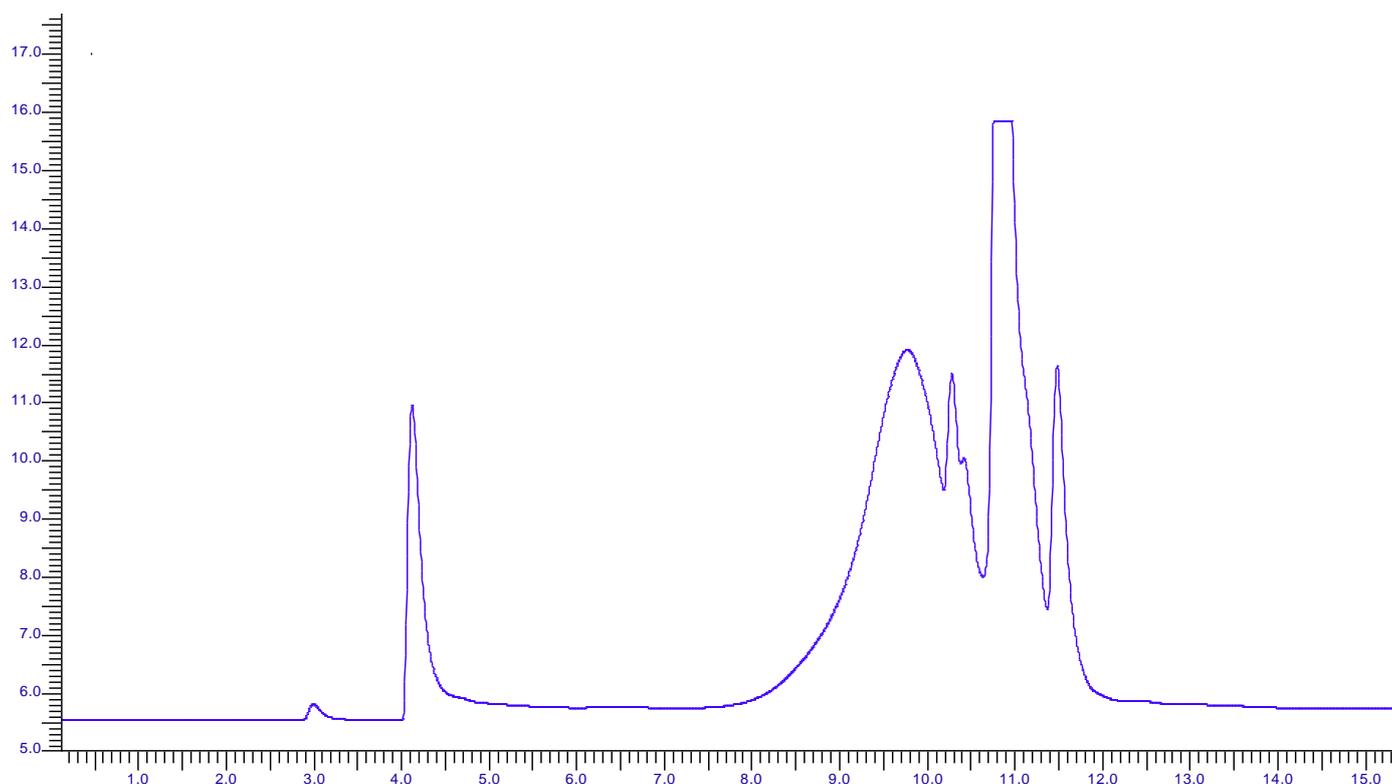


Figura 12 - Cromatograma obtido com a coluna Coluna KINETEX® Allcrom EVO C18 100A

Ao reduzir a porosidade da coluna, obteve-se uma melhor resolução dos picos cromatográficos. Porém, apesar disso, não foi possível realizar a separação eficiente dos picos, não sendo possível determinar os compostos separadamente.

### 5.5. Condições cromatográficas para o sistema LC-MS/MS

A tabela 6 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação de fluoroquinolonas.

Tabela 6 - Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS.

Parâmetros	LC-MS/MS
Coluna analítica	Pursuit XRs Ultra C <sub>18</sub> 100 × 2.0 mm (d. i.) e 2.8 µm tamanho de partícula
Fase móvel	(A) Solução aquosa de ácido fórmico pH 3 e (B) acetonitrila

Gradiente	95% (A) em 0 min; alterando até 5% (A) em 7 min; retornando a condição inicial até 8 min
Vazão	0,15 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	10 µL
Detector	Espectrômetro de massas, triplo quadrupolo, operando no modo MS/MS

Os íons característicos de cada composto em estudo foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo 3 (Q3) foi realizada varredura do íon produto variando as energias de colisão, a fim de otimizar as melhores condições de detecção. A partir deste estudo prévio, constatou-se que o modo de ionização por eletronebulização positiva apresentou melhor resultado para os compostos analisados. Além disso, voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar os íons produtos também foram estudadas. Após, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a etapa de quantificação (transição de maior intensidade) e identificação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados. A tabela 7 apresenta as fluoroquinolonas analisadas por LC-MS/MS utilizando ESI +, no modo SRM com seus respectivos íons precursores e produtos e energias de colisão.

Tabela 7 - Transições SRM utilizadas na determinação das fluoroquinolonas no sistema LC-MS/MS, massa molar (MM), modo de ionização (ESI +), razões massa/carga (m/z) utilizadas para os íons precursor e produto, energia do cone (V) e energia de colisão (eV).

Compostos	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Modo de Ionização	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Cone (V)	Colisão (V)
Ciprofloxacino	331.3	ESI +	332.0	287.9	25	15.5
				313.6	25	19
Danofloxacino	357.4	ESI +	358.1	339.8	25	21.5
				313.9	25	16
Difloxacino	399.4	ESI +	400.0	355.9	25	18
				299.0	25	26.5
Enrofloxacino	359.4	ESI +	360.1	315.9	25	17
				341.9	25	20
Norfloxacino	319.3	ESI +	320.0	275.9	25	15
				301.9	25	18.5

Os resultados obtidos utilizando fase móvel aquosa com aditivo ácido fórmico e metanol como fase orgânica, não apresentaram boa resposta, pois os picos obtidos foram menos intensos para vários compostos e ainda alguns não foram detectados. Por outro lado, a utilização da combinação de acetonitrila e ácido fórmico, foi eficiente na eluição dos compostos, apresentando sinal analítico aceitável. Observa-se que todos os compostos apresentaram tempos de retenção muito similares. Sendo assim, a detecção de fluoroquinolonas só pode ser efetuada devido à alta seletividade do detector de massas operando no modo SRM.

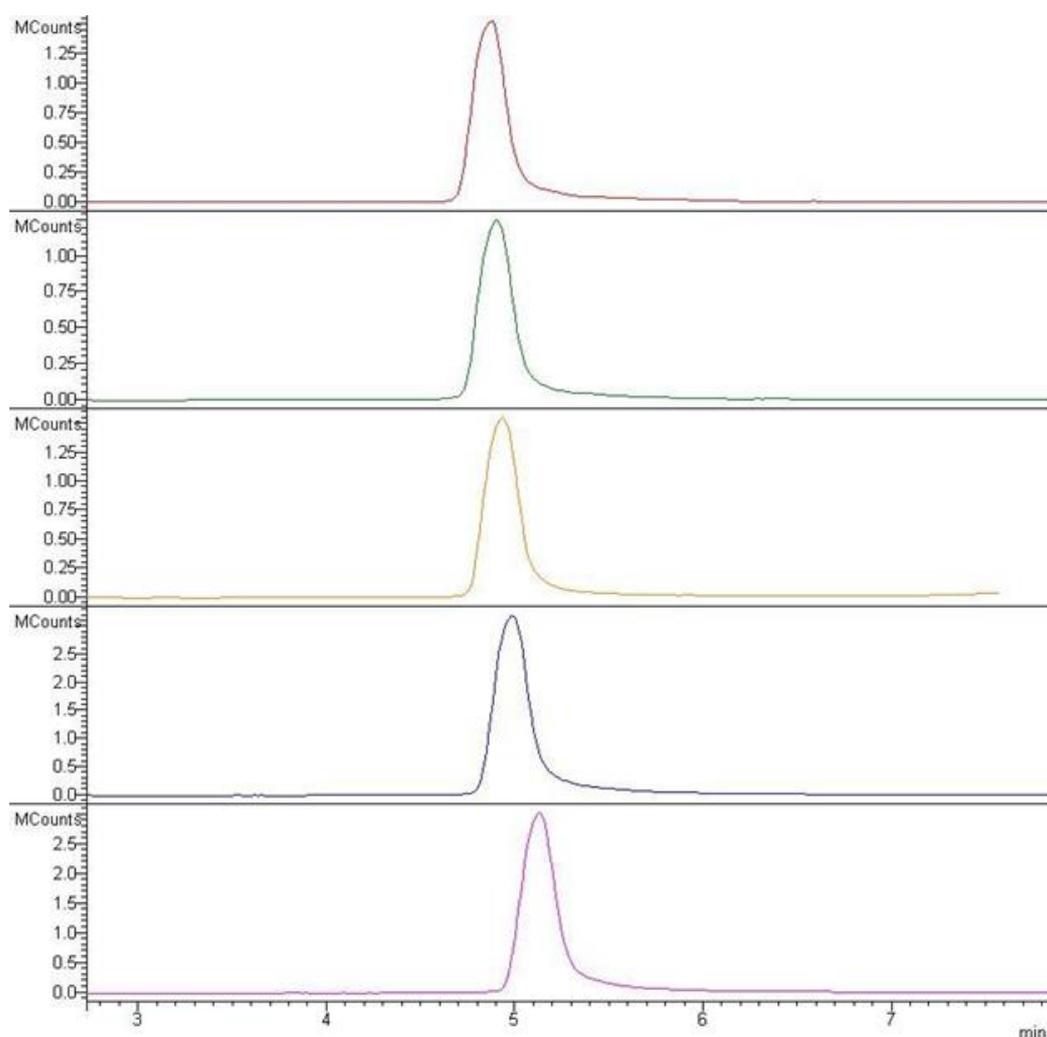


Figura 13 – Cromatograma de uma solução padrão (100 µg.L-1) em acetonitrila obtido no modo SRM por LC-MS/MS.

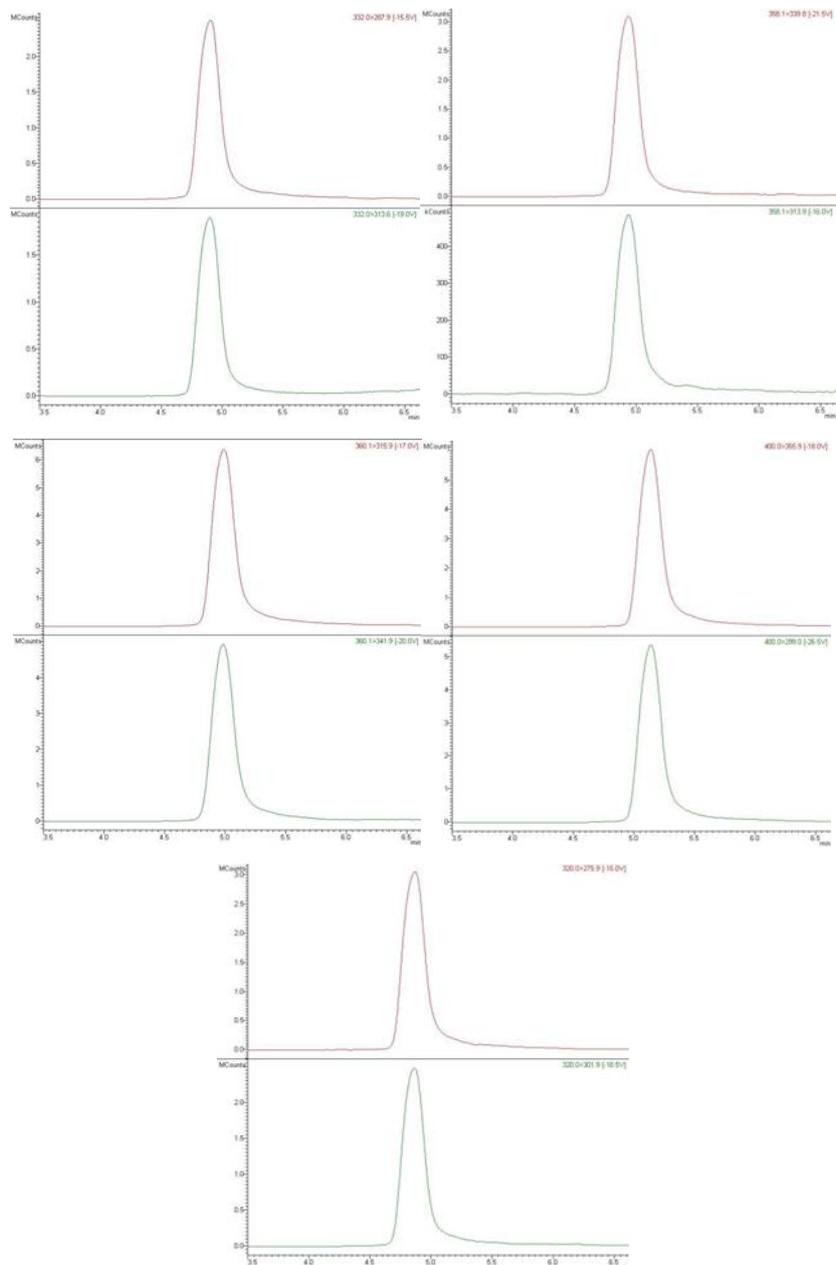


Figura 14 - Cromatogramas das transições monitoradas para cada composto.

## 6. CONCLUSÃO

A cromatografia é um instrumento importante na análise de diversos compostos, e possibilita a determinação de múltiplos analitos em uma mesma amostra.

Com isso, é de grande valia avaliar as condições cromatográficas e estudar os melhores parâmetros para otimizar a separação dos compostos de interesse, a fim de facilitar a análise destes através de um detector apropriado.

O método estudado mostrou-se seletivo para fluoroquinolonas, apresentando boa resposta e intensidade de emissão no equipamento. Entretanto, a cromatografia líquida de alta eficiência nas condições utilizadas de coluna, fase móvel, fluxo de solvente e programa de gradiente, não mostrou suficiente capacidade de separação para os compostos danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino e norfloxacino no sistema HPLC-FD.

Já no sistema LC-MS/MS, apesar de os cinco compostos relacionados co-eluírem, é possível determinar cada um separadamente, devido à alta seletividade do detector. O monitoramento de íons precursor e produto é efetivo na avaliação dos sinais e permite identificar cada composto devido às características de cada um individualmente.

## **7. PERSPECTIVAS**

Realizar novos testes variando-se a proporção entre as fases móveis na coluna cromatográfica com menor porosidade no sistema HPLC-FD

Desenvolver um método de extração de fluoroquinolonas para determinação desses compostos em matrizes animais, como carne, leite e ovos, para posterior detecção em sistema HPLC-FD ou LC-MS/MS.