



## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO ANALÍTICA DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DO ANTIBIÓTICO FLORFENICOL EM CARNE DE TILÁPIAS POR LC-MS/MS

Aline Gabriela Costa **Roque**<sup>1</sup>, Eduardo Adilson **Orlando**<sup>2</sup>

Nº 14210

**RESUMO** - *Uma das formas de se garantir o controle microbiano de pisciculturas é a utilização de antibióticos, como o florfenicol. Como a demanda de pescado vem aumentando, e com isso um aumento no uso de antibióticos, tornou-se necessária a determinação precisa e sensível de resíduos desses fármacos em carnes. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método para determinação de resíduos do antibiótico florfenicol e seu metabólito florfenicol amina em filé de Tilápia por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS). A etapa inicial de desenvolvimento do método consistiu em avaliar as condições de detecção e separação do florfenicol e florfenicol amina no LC-MS/MS, seguido de comparação de fases estacionárias de extração em fase sólida: C18, fenil e Oasis. O cartucho fenil apresentou os melhores resultados, e as condições de extração da matriz foram otimizadas com planejamento fatorial fracionário. Finalmente o método foi validado e aplicado em amostras destinadas ao consumo humano.*

**Palavras-chaves:** Tilápia, florfenicol, resíduos, cromatografia líquida.

**ABSTRACT-** *One way to ensure the control of microbial fish farming is the use of antibiotics, such as florfenicol. As the demand for fish is increasing, and with it an increase in the use of antibiotics, it became necessary to determine accurate and sensitive residue these drugs in meat. This study aimed to develop a method for determination of residues of antibiotic florfenicol and its metabolite florfenicol amine in fillet of Tilapia by high efficiency liquid chromatography with detection by mass spectrometry (LC-MS/MS). The initial stage of method development was to evaluate the conditions of separation and detection of florfenicol and florfenicol amine in LC-MS/MS, followed by comparison of stationary phases for solid phase extraction: C18,*

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, FAJ, Jaguariúna-SP; [aline.c.roque@gmail.com](mailto:aline.c.roque@gmail.com)

2 Orientador: Pesquisador do CTC- ITAL, Campinas-SP; [eduardo.orlando@ital.sp.gov.br](mailto:eduardo.orlando@ital.sp.gov.br)

*phenyl and Oasis. The phenyl cartridge showed the best results, and the matrix extraction conditions were optimized with fractional factorial design. Then the method was applied and validated in samples intended for human consumption.*

**Key-words:** Tilapia, florfenicol, waste, liquid chromatography

## 1. INTRODUÇÃO

A Tilápia (*Oreochromis sp*) é a espécie mais produzida e de maior importância na aquicultura do Brasil e sua criação é feita, na maioria das vezes, em tanques-rede. Entretanto, neste cultivo intensivo a qualidade da água e a ação de agentes infecciosos são motivos de grandes preocupações, podendo resultar em atrasos no crescimento e uma mortalidade considerável, ocasionando prejuízo para o produtor. Portanto se faz necessário um controle microbiano eficaz nesse ambiente, sendo comumente utilizado o emprego de antimicrobianos (HIRSCH, R., 1999).

Atualmente, a forma de administração mais comum dos antimicrobianos é pela incorporação junto às rações utilizadas. Os compostos mais utilizados para esse fim são a oxitetraciclina e o florfenicol. O florfenicol (Figura 1) é um bacteriostático, pertencente à classe dos anfenicóis com amplo espectro de ação contra bactérias gram negativo e gram positivo. O florfenicol amina (Figura 1) é um metabólito do florfenicol (MOORE, E., 2007).

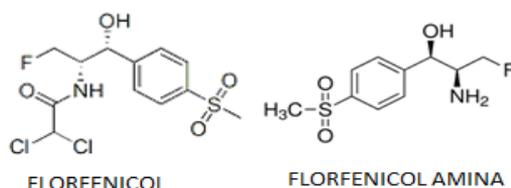


Figura 1: estrutura molecular do FF e FFA.

No entanto, o uso de antimicrobianos na piscicultura tem sido um motivo de preocupação para consumidores e autoridades competentes. Seu uso de maneira indiscriminada promove o surgimento de micro-organismos resistentes e diminui a eficácia nos tratamentos, além de causar possíveis efeitos tóxicos em humanos (CAÑADA, F, 2009). Como a demanda de pescado vem aumentando, e com isso um aumento no uso de antimicrobianos, tornou-se necessária a determinação precisa de resíduos desses medicamentos na carne de pescado. A fim de proteger a saúde humana, as autoridades reguladoras em alimentos de todo o mundo estabeleceram



limites máximos de resíduos (LMR) para medicamentos veterinários em produtos de origem animal destinados ao consumo humano. O LMR para florfenicol nos EUA, Brasil e Europa é de 1000 µg/kg (CAÑADA, F., 2009; Brasil, 2009).

Vários métodos analíticos são encontrados na literatura para a análise de florfenicol (FF) e seu metabólito florfenicol amina (FFA). Como método de detecção tem-se principalmente espectrometria de massas (ZHANG, S.,2008) e UV (WRZESINSKI, C.,2003; VUE, C.,2002). A extração em fase sólida (SPE) é a técnica mais utilizada para extração dos analitos e *clean up* de interferências de matrizes cárneas (ZHANG, S.,2008; WRZESINSKI, C.,2003; VUE, C.,2002). Este trabalho teve como objetivo desenvolver, otimizar e validar um método analítico para análise de resíduos de FF e FFA em filé de Tilápia, utilizando SPE como técnica de extração e a detecção por LC-MS/MS, tendo em vista a ausência de métodos publicados no Brasil e também para a espécie Tilápia, que tem grande impacto econômico para a aquicultura brasileira.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais e equipamentos**

Os cartuchos de SPE com fase C18, e fenil foram obtidos de Applied Separations (EUA) enquanto os com fase Oasis-HLB (do inglês: *Hydrophilic Lipophilic Balanced*) foi adquirido de Waters (EUA). Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência modelo Acquity acoplado a detector espectrômetro de massas triploquadroplo, ionização por *electrospray*, modelo Xevo TQD (Waters, EUA).

### **2.2 Otimização das condições de detecção e separação**

Utilizou-se solução de padrões de FF e FFA para obter espectros de varreduras no espectrômetro de massas em modo positivo e negativo da relação  $m/z$ , buscando-se o íon precursor mais intenso. A seguir foi iniciada a fragmentação do íon precursor por injeção do gás de colisão e monitoramento dos íons produto. Para cada analito duas diferentes transições foram obtidas. Nas condições ótimas de detecção encontradas foram feitas injeções de soluções padrão de FF, FFA e em misturas, para avaliar os respectivos tempos de retenção e a resolução entre picos. As condições cromatográficas foram ajustadas através de variação das proporções da fase móvel.

### **2.3 Otimização da etapa de extração em fase sólida (SPE)**

A etapa seguinte consistiu em comparar as fases estacionárias C18, fenil e fase polimérica OASIS quanto a eficiência de extração dos analitos FF e FFA. Após definição da fase estacionária mais adequada, foram avaliadas variações nos



seguintes parâmetros da etapa de SPE visando a melhoria da eficiência de extração do FFA: volume de ressuspensão dos analitos; volume de lavagem do cartucho; volume de eluição com solução de metanol contendo ácido acético 0,1%.

#### 2.4 Otimização do método de extração na matriz

Para a extração dos analitos da matriz peixe utilizou-se inicialmente o método proposto por ZHANG, S.,2008 que foi otimizado para matriz peixe visando uma máxima eficiência de extração. Para isso fez-se uso de um planejamento experimental fatorial fracionário  $2^{4-1}$  quatro fatores e dois níveis cada, como identificados na Tabela 2.

**Tabela 1:** Identificação dos fatores e níveis avaliados no método de extração

Código Fator	Identificação	Nível -	Nível +
C1	Volume de acetato de etila	6 ml	10 ml
C2	Proporção $\text{NH}_4\text{OH}$ :acetato de etila	98:2	95:5
C3	Concentração de ácido acético	2%	5%
C4	Volume de n-Hexano	2 ml	4 ml

#### 2.5 Validação Analítica

##### 2.5.1 Especificidade/seletividade

Foi avaliado com a análise de amostras branco de filés de Tilápia, obtidas de fonte com criação isenta de uso de antibióticos. Foram comparados os cromatogramas resultantes com cromatogramas de amostras branco fortificadas com os padrões.

##### 2.5.2 Linearidade

Foi realizada uma curva analítica com fortificação da matriz branco com cinco pontos. Através da construção de um gráfico de resposta de área de cada pico *versus* concentração de FF e FFA, avaliou-se a existência de valores discrepantes por visualização do gráfico de resíduos padronizados e da linearidade da curva pelo coeficiente de determinação  $R^2$ .

##### 2.5.3 Precisão e exatidão

Avaliou-se a repetibilidade pelo coeficiente de variação (CV) da análise de uma mesma amostra em quintuplicata para dois níveis de fortificação, 250 e 1000 ppb. Avaliou-se também a reprodutibilidade ou precisão interdias através do CV da análise de uma mesma amostra em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada pela eficiência de extração ou recuperação, calculada através da comparação entre o sinal obtido pela análise cromatográfica de um extrato de amostra branco fortificado após todas as



etapas de extração, com o sinal obtido de análise de amostra com mesma fortificação realizada antes das etapas de extração. Foi avaliada em três níveis de fortificação.

#### 2.5.4 Limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ)

O LoD foi calculado como a concentração de analito presente na amostra que gerou um pico com intensidade acima de 3 vezes a relação sinal/ruído da linha de base cromatográfica e para o LoQ foi considerado 10 vezes a relação sinal/ruído.

#### 2.6 Aplicação da metodologia validada em amostras reais

Para exemplificar a aplicação do método desenvolvido foram realizadas análises de amostras de Tilápia fornecidas pela EMBRAPA Meio Ambiente, Laboratório de Ecossistemas Aquáticos, localizada em Jaguariúna - SP, coletadas no lago de Furnas-MG. Foi analisado (duplicata) um total de 15 amostras utilizando o método validado, obtidas de 3 diferentes criadores com 5 diferentes pontos de coleta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Otimização das condições de detecção e separação

Para o FF a varredura no modo positivo apresentou vários íons precursores referentes a vários adutos do florfenicol, resultando em diminuição do sinal. Já no modo negativo houve apenas um íon com intensidade considerável que foi o de  $m/z$  356,05 sendo escolhido com íon precursor. Os íons produto escolhidos foram o de  $m/z$  185,1 denominado qualitativo, e o  $m/z$  336,1 denominado quantitativo. Para o FFA o modo positivo apresentou um íon precursor mais intenso de  $m/z$  248. Os íons produto escolhidos foram o de  $m/z$  130,1 como quantitativo e de  $m/z$  151,1 como qualitativo.

As melhores condições de separação foram obtidas com fluxo de 0,3 ml/min, fase móvel 80:20 (água:acetonitrila) e tempo de corrida 5 minutos. A figura 6 mostra o cromatograma da análise de uma solução padrão simulando 500 ppb de FF e FFA.

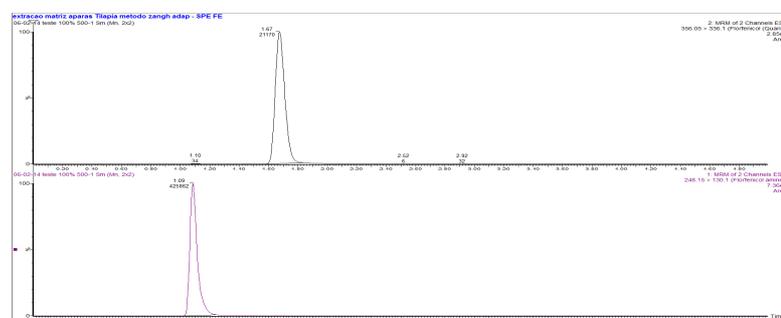


Figura 2: Cromatogramas de uma solução padrão de FF e FFA nas condições ideais de separação e detecção.



### 3.2 Otimização da etapa de extração em fase sólida (SPE)

#### 3.2.1 Comparação de diferentes tipos de fases estacionárias de SPE

A fase C18 foi o que apresentou menor recuperação (<20%) e as fases fenil e OASIS tiveram eficiências próximas, sendo consideradas adequadas para o FF (>80%), porém baixa para FFA (<50%). Assim, com a otimização das condições foi possível obter melhores resultados de eficiência de extração do FFA. Para a etapa de validação do método foi escolhida a fase estacionária fenil no SPE devido ao seu custo inferior comparado a fase OASIS. Os valores de volume avaliados, bem como os resultados de eficiência de extração obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: variações de volume avaliadas e resultados de eficiência de extração obtidos (n=2)

Volume de dissolução dos analitos (ml)	Volume de lavagem (ml)	Volume de eluição (ml)	Eficiência de extração FFA (%)	Eficiência de extração FF (%)
4	0	5	9,7	87,7
2	0	5	16,2	87,5
1	0	5	5,2	63,0
2	2	5	36,7	95,1
2	1	5	83,0	96,3
2	0	8	31,1	100,4

Com os resultados obtidos foi possível concluir que a ressuspensão dos analitos em 2 ml de ácido acético 5%, etapa de lavagem com 1 ml e etapa de eluição com 8 ml foram as condições que conduziram a melhor eficiência de extração atingindo acima de 80% para o FFA e próximo a 100 % para o FF.

#### 3.2.2 Otimização do método de extração na matriz

Os resultados obtidos no planejamento fatorial estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7: resultados da significância dos efeitos avaliados no método.

Fatores	C1	C2	C3	C4
FFA	NS	SG (-)	SG (-)	NS
FF	SG (+)	NS	NS	NS

NS: Efeito não significativo; SG (-): Significativo negativamente; SG (+): Significativo positivamente.

Com isso, o método completo otimizado foi: pesou-se 2,0 g de amostra e foram adicionados 10 ml de acetato de etila:  $\text{NH}_4\text{OH}$  (98:2), seguido de agitação em vortex por 1 minuto e centrifugação a 6000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o sólido foi extraído novamente com 10 ml de acetato de etila, e os sobrenadantes



foram combinados. Em seguida, adicionou-se 1 ml de ácido acético 2% ao extrato e levou-se para evaporação em fluxo N<sub>2</sub> e banho maria a 45° C, até o volume atingir abaixo de 1 ml. O líquido restante foi transferido para tubo de centrifuga de 15 ml e o tubo de ensaio anterior foi lavado com 1 ml de ácido acético 2%. Acrescentou-se 2 ml de n-hexano, agitou-se em vortex e centrifugou-se. A fase superior hexânica foi descartada e o processo de adição de n-hexano repetido, sendo a solução resultante utilizada para a etapa de SPE. O cartucho fenil utilizado foi condicionado com 2 ml de metanol e 2 ml de água, seguido da inserção do extrato da amostra. A seguir, o cartucho foi lavado com 1 ml de ácido acético a 2. Finalmente realizou-se a eluição com 8 ml de metanol com ácido acético 0,1%, seguido de evaporação e ressuspensão em 2 ml de solução 80:20 (água:acetonitrila) e filtração PVDF de 0,22 µm.

### 3.3 Validação do Método

Na avaliação da seletividade não foram observados picos interferentes no mesmo tempo de retenção para nenhum dos analitos, indicando que a resposta obtida está sendo seletiva aos analitos. Isso é facilitado pela grande capacidade do detector em selecionar apenas os íons e transições de interesse, gerando cromatogramas “limpos”. Um resumo dos demais parâmetros avaliados está apresentado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados obtidos na etapa de validação

Concentração (ng g <sup>-1</sup> )	CV Intradias		CV Interdias		Exatidão (%)			LoD	LoQ	R <sup>2</sup>
	250	1000	250	1000	320	560	1030			
FF	20	22	35	33	79,0	74,6	79,9	6 ppb	25 ppb	0,994
FFA	6	27	24	28	38,1	41,8	52,4	1 ppb	3 ppb	0,995

Os valores de precisão obtidos indicaram desvios considerados altos no método na reprodutibilidade, podendo ser resultado da variação na ionização por *electrospray*. Possivelmente a adição de um padrão interno poderia melhorar os resultados. Esse resultado confirmou a necessidade de elaboração de curva analítica simultânea em todas as amostras a serem analisadas posteriormente. A linearidade das curvas foi considerada adequada, com o valor do R<sup>2</sup> acima de 0,99, indicando regressões significativas. O LOD e LOQ confirmaram a possibilidade de utilização do método para análise de resíduos do antimicrobiano em peixe. Os valores de exatidão para o FF foram adequados com recuperação sempre acima de 70%, já para o FFA a recuperação ficou abaixo de 50%, indicando a necessidade de elaboração da curva na matriz para compensar perdas de extração.



### 3.4 Aplicação da metodologia validada em amostras reais

Dentre as 15 amostras avaliadas, apenas uma apresentou algum tipo de resíduo em concentração acima do LoD, mas ainda com concentração inferior a curva analítica inicialmente elaborada. A amostra em questão apresentou resíduo de FF acima do LoQ e por isso foi quantificada, sendo necessário a extensão da curva para pontos de mais baixa concentração. A análise dessa amostra demonstrou a presença de 30,34 ppb de FF, valor muito abaixo do LMR estabelecido no Brasil.

## 4. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método analítico sensível para determinação de FF e FFA em filé de Tilápia á nível de resíduo. Na etapa de extração dos analitos, a fase estacionária de SPE mais adequada foi a fenil. O método foi validado e apresentou bom desempenho analítico, sendo aplicado para análise de amostras destinadas ao consumo humano.

## 5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e pelas portas abertas em meu caminho. Agradeço a CNPq pela bolsa concedida, ao meu orientador, Eduardo, pela paciência, compreensão e confiança depositada em mim desde o início. Aos meus pais Yolanda e Carlos por sempre me incentivarem e me apoiarem na minha carreira. E finalmente agradeço a Comissão PIBIC pela organização do programa e informações prestadas.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa nº 24**, Anexo I, de 14/07/2009, Sistema de Consulta à Legislação.
- CAÑADA, F.; PENA, M.; MANSILLA, A. E. Review: Analysis of antibiotics in fish samples. Badajoz, Espanha: **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 395, 987-1008, 2009.
- HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The science of the Total Environment** 225, 109-118, 1999.
- MOORE, E. Florfenicol. **Journal of Exotic Pet Medicine** 16 (1), 52-54, 2007.
- VUE, C.; SCHMDIT, L.; STEHLY, G.; GINGERICH, W. Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. **Journal of Chromatography B**, 780, 111–117, 2002.
- WRZESINSKI, C.; CROUCH, L.; ENDRIS, R. Determination of Florfenicol Amine in Channel Catfish Muscle by Liquid Chromatography. **Journal of AOAC international**, vol. 86, NO. 3, 515-520, 2003.
- ZHANG, S.; LIU, Z.; GUO, X.; CHENG, L.; WANG, Z.; SHEN, J. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 875, 399–404, 2008.