

DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINAS EM LEITE POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA

DETERMINATION OF TETRACYCLINE IN MILK BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Ana Ferreira de Lemos¹, Ana Margarida de Almeida¹, João Martins Medeira¹, Ana Lúcia Rodrigues²

¹ – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa

² – Centro de Investigação em Ciências Veterinárias (CICV), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa.

RESUMO: As tetraciclinas são compostos antibacterianos utilizados em bovinos de leite para tratamento de doenças infecciosas, como a mastite, mas também como aditivos em ração animal. O uso das tetraciclinas pode conduzir à presença de resíduos destes fármacos no leite, principalmente se não forem utilizados de acordo com as indicações, nem respeitado o período mínimo de eliminação dos antibióticos pelo leite.

A presença de resíduos de antibióticos no leite interfere no processo industrial dos seus derivados, podendo inviabilizar a produção destes e, consequentemente, causar igualmente prejuízos económicos, como por exemplo, pela inibição de fermentos lácticos que são culturas de microorganismos utilizados na produção de iogurtes, queijos e outros produtos lácteos. Os resíduos de antibióticos no leite de consumo podem representar riscos à saúde humana, podendo causar reacções alérgicas em indivíduos sensíveis ou ter um efeito adverso na flora intestinal humana, prejudicando a sua acção protectora local, além de propiciar a selecção de populações bacterianas resistentes. (Denobile & Nascimento, 2004)

Palavras-chave: tetraciclinas, análise de leite, cromatografia de camada fina, segurança alimentar.

ABSTRACT: The tetracyclines are antimicrobial agents used in dairy cattle to treat infection diseases, as mastitis, but also as additives in animal food to improve feed efficiency and growth. The use of tetracyclines can result in the presence of residue of these antimicrobials in the milk, especially if they are not used according to the label directions and if the minimum period of their elimination is not respected.

The presence of antibiotic residues in the milk interferes in the dairy industrial process diminishing starter culture growth used in the yogurt and cheese production, causing strong economic loss. Antibiotic residue in the consumer milk may represent risk to the human health, allows allergic reactions in sensitive human beings, disorders of the intestinal flora damaging its local protection action and provides antibiotic resistance development.

Keywords: tetracyclines, milk analysis, thin layer chromatography, food safety.

INTRODUÇÃO

A Segurança Alimentar é um tema cada vez mais relevante face ao aumento da procura por uma melhor qualidade de vida e consciencialização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros para a saúde.

Para protecção do consumidor, a legislação comunitária exige que seja feita uma avaliação de segurança do medicamento

veterinário, antes da sua introdução no mercado, dado que só podem ser autorizados em condições que garantam a protecção do animal e do consumidor. A Directiva 2001/82/CE, de 6 de Novembro de 2001, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários, alterada pela Directiva 2004/28/CE, de 31 de Março de 2004, pelo Regulamento (CE) n.º 470/2009 e pelo Regulamento (CE) n.º 37/2010, prevê um processo comunitário para o estabelecimento

de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, vindo assim implementar na União Europeia procedimentos para avaliação de segurança.

De acordo com os padrões definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumidor padrão, considerando um indivíduo adulto com 60 kg de peso, deve ingerir diariamente uma determinada quantidade de alimentos. De modo a avaliar o risco causado pela exposição a uma substância, as entidades reguladoras, requerem testes específicos para efectuar essa avaliação, sendo que esta engloba os riscos toxicológicos, o risco ambiental, os efeitos microbiológicos e farmacológicos dos resíduos das substâncias farmacologicamente activas presentes nos medicamentos veterinários.

A avaliação dos riscos fármaco-toxicológicos é realizada em animais de laboratório, para determinação da ingestão diária admissível e do nível máximo de uma substância a que os animais de laboratório podem ser expostos, sem que sejam observados quaisquer efeitos deletérios. Após esta avaliação, estabelecem-se então os limites máximos de resíduos ou determina-se a proibição do uso da substância (Directiva 2004/28/CE, de 31 Março; Regulamento 470/2009, de 6 de Maio)

O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é a concentração máxima de resíduos resultantes do uso de um medicamento veterinário (em mg/Kg ou µg/Kg) que é aceite pela Comunidade Europeia como aceitável ou legalmente permitido em géneros alimentícios, estipulado na Norma da Comunidade Europeia (EEC) No 2377/90, em leite, para as

tetraciclina de 100 µg/Kg. (Pena *et al* 1998; Rodrigues 2012)

As tetraciclina (figura 1) representam uma das mais importantes famílias farmacológicas e, tendo em conta o seu largo espectro de acção bacteriostática, são usadas, como tratamento de primeira escolha, nas infecções bacterianas causadas por *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Brucella* e *Spirochaetaceae*. São ainda frequentemente utilizadas em medicina veterinária, em nutrição animal e em aditivos alimentares destinados a uso pecuário, estando indicadas para diversas infecções bacterianas, Gram-positivas e Gram-negativas. (Denobile & Nascimento, 2004; Rodrigues, 2012). Estes fármacos agem através da inibição da síntese proteica dos microrganismos sensíveis, ao ligarem-se aos ribossomas, principalmente à sub-unidade 30S, bloqueando a ligação deste aos aminoacil-tRNAs impedindo, desta forma, a ligação códon/anticódon. (Spinosa *et al* 2006)

As tetraciclina são amplamente utilizadas no tratamento de doenças veterinárias e como suplemento alimentar. A sua administração pode ser feita via intramamária, para o tratamento de mastite, por via parentérica (intramuscular, intravenosa, subcutânea) na terapia de infecções; por via intra-uterina para o tratamento de infecções uterinas, cervicais e vaginais, e por via oral, para o tratamento de doenças ou como “promotores de crescimento”, em doses subterapêuticas. Como tal, têm tido uma larga utilização em medicina veterinária, podendo aparecer facilmente no leite. (Denobile & Nascimento, 2004)

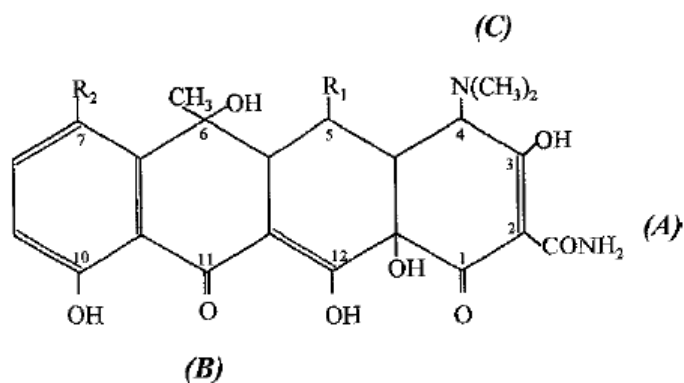


Figura 1. Estrutura da tetraciclina (Denobile, M.; Nascimento, E.S, 2004)

Para monitorizar os resíduos de antibióticos em leite, são comumente usados testes de rastreio imunológicos e de inibição microbiológica, além de técnicas analíticas sensíveis e específicas para a identificação e quantificação de resíduos de antibiótico no leite. (Denobile & Nascimento, 2004)

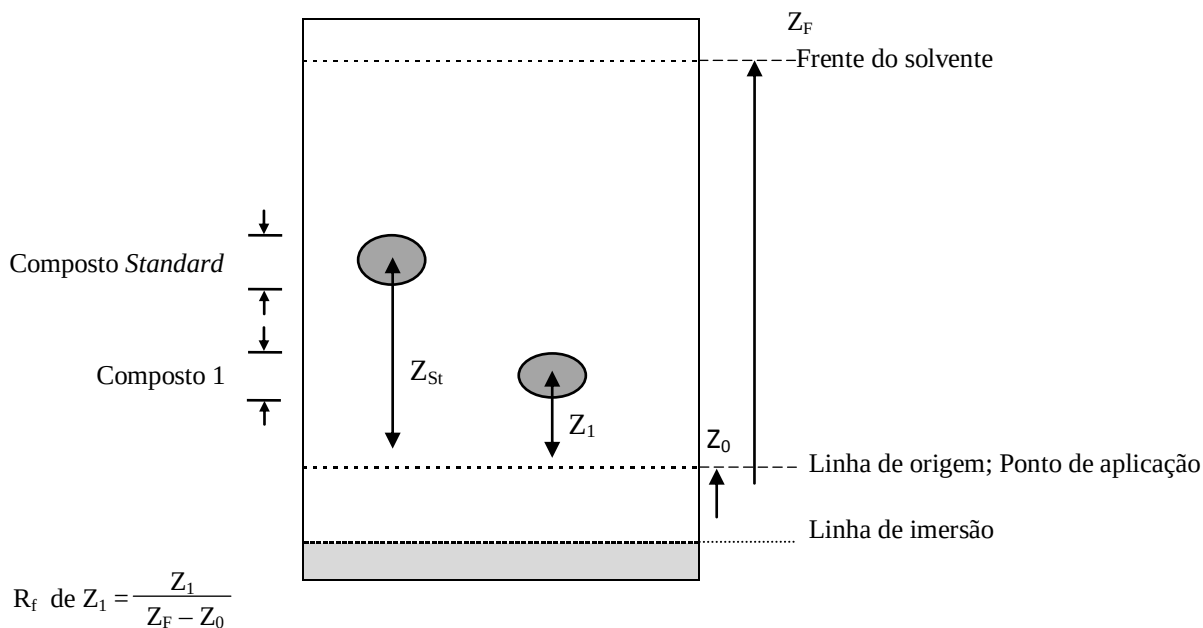
A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal modo que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais. Há várias formas de se realizar cromatografia e vários critérios são usados para sua classificação. (Santos *et al* 2011)

Na cromatografia de camada fina, o parâmetro básico usado na diferenciação dos

compostos pretendidos dos outros separados, por comparação com padrões, é o factor de retenção (R_f), sendo a principal característica de comparação (figura 2). (Belas, 2012)

Esta técnica de detecção é um método fácil, rápido, económico e sensível, principalmente quando combinada com o método de revelação. Este método complementar de confirmação tem por base a aspersão da placa de cromatografia com reagentes de revelação específicos para cada composto em estudo, verificando-se o aparecimento de uma coloração característica (compostos cromóforos), consoante os grupos funcionais. (Belas 2012; Rodrigues, 2012)

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver, através da cromatografia de camada fina, uma metodologia analítica simples, sensível, rápida e relativamente barata de extracção e detecção de tetraciclina em amostras comerciais de leite.



onde

R_f = factor de retenção

Z_1 = distância percorrida pelo composto da linha de origem [mm]

Z_F = distância entre a linha de imersão e a frente do solvente [mm]

Z_0 = distância entre a linha de imersão e a linha de origem [mm]

Figura 2. Representação de cromatograma obtido por Cromatografia de camada fina e determinação do factor de retenção (R_f). (Hahn-Deinstrop, E., 2007)

MATERIAL E MÉTODOS

Iniciou-se o procedimento precipitando as proteínas do leite com acetonitrilo (J.T. Baker®) na centrífuga (B. Braun®, Sigma 4K10) e extraiu-se a tetraciclina com clorofórmio. Fez-se solução padrão de antibiótico, completando-se com etanol, num total de 1000 µg/mL.

Para a extração adicionaram-se 40 mL de acetonitrilo (J.T. Baker®) a 20 mL de leite. Precipitaram-se as proteínas a 3500 rpm durante 15 minutos e extraiu-se o sobrenadante para uma ampola de decantação. Adicionaram-se 20 mL de clorofórmio e extraiu-se a fase inferior, repetindo-se este procedimento duas vezes. Adicionou-se 1 g de sulfato de sódio anidro, decantou-se e evaporou-se até à secura num evaporador rotativo.

Usou-se placa de cromatografia com as medidas de 3,5 cm de largura por 8,5 cm de comprimento, colocando num primeiro ponto tetraciclina, no segundo tetraciclina + extracto de leite e, no último, extracto de leite. O eluente usado foi butanol, ácido acético e água (3:1:1, v/v/v). A placa secou à temperatura ambiente e posteriormente leu-se na lâmpada de UV (UV Qlabo®) a 254 e 366 nm, de forma a delimitar as manchas dos padrões.

Adicionou-se cuidadosamente 8 mL de H_2SO_4 e 0,5 mL de anisaldeído (4-metoxibenzaldeído), arrefecendo com gelo, a uma mistura de 85 mL de metanol e 10 mL de ácido acético glacial (Panreac®), de forma a obter o reagente de pulverização *p*-anisaldeído. A detecção foi feita, assim, com cromatografia de camada fina, sob luz UV a 366 nm e com o reagente de pulverização. A revelação foi feita em 5 minutos em estufa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O limite de detecção (LD) da tetraciclina é 0,008 microgramas e é visualizada a 254 e 366 nm. Os resultados do factor de retenção (R_f) foram obtidos através da medição da distância do ponto de aplicação ao meio das manchas, a dividir pela distância que o eluente percorreu (7 cm) (tabela 1).

Tabela 1. Determinação do factor de retenção (R_f)

Tetraciclina	0,45
Tetraciclina + Extracto	0,48
Extracto	0,33

Após pulverização das placas com o reagente *p*-anisaldeído e colocação em estufa durante 5 minutos, obteve-se a cor verde (figura 3), indicando a presença de tetraciclina nas amostras de tetraciclina, tetraciclina + extracto e extracto, confirmando a presença de tetraciclina na amostra de extracto de leite em estudo (tabela 2).



Figura 3. Placas de cromatografia, após pulverização e aquecimento em estufa

Tabela 2. Parâmetros de identificação do antibiótico em estudo.

Antibiótico	Tetraciclina
Luz UV (nm)	366
Limite de Detecção (µg/mancha)	0,008
Reagente de visualização	<i>p</i> -anisaldeído
Cor	Verde

CONCLUSÃO

Tendo em vista os vários efeitos indesejáveis que os resíduos de antibióticos no leite acarretam, cresce a preocupação com produtores de leite, indústria e consumidores, sendo recomendada a frequente monitorização da presença de resíduos de antibióticos em leite cujos limites são estipulados na legislação europeia e internacional. (Santos *et al* 2011)

Para uma monitorização contínua dos diferentes princípios activos disponíveis no mercado é necessária a utilização de metodologias rápidas, sensíveis e confiáveis, tanto nos testes de rastreio, que detectam grupos de antibióticos, como em métodos cromatográficos que identifiquem e quantifiquem as moléculas confirmando o princípio activo presente. (Santos *et al* 2011)

A cromatografia de camada fina permite-nos apenas qualificar os grupos de antibióticos, não sendo um método quantitativo. Assim, torna-se economicamente mais viável que outro tipo de técnicas. (Schencka & Calleryb, 1998)

No que concerne aos limites de detenção, valores inferiores não excluem a presença de tetraciclina, porém não são identificáveis por esta metodologia.

Utilizando este procedimento é possível detectar a presença de tetraciclina através da observação em lâmpada UV em dois comprimentos de onda e pela pulverização do reagente *p*-anisaldeído, pela presença de coloração.

Os factores de retenção obtidos foram diferentes, uma vez que as concentrações de

tetraciclina em cada amostra são diferentes, havendo também influência da amostra de extracto de leite, concluindo-se este factor pela amostra de tetraciclina + extracto ser a que apresenta o resultado mais elevado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belas, A.J. (2012). Resíduos de medicamentos veterinários em mel. *Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar*. FMV, UTL, Lisboa, p. 32.
- Denobile, M., Nascimento, E.S. (2004). Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(2), 209-218.
- Directiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001. Estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L311
- Directiva 2004/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março. Estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários. *Jornal Oficial da União Europeia*, L136.
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). Introduction. In: *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes* (2ª ed., p. 6). Berlin: Wiley-VCH Verlag.
- Pena, A., Carmona, A., Barbosa, A., Lino, C., Silveira, I, Castillo, B. (1998). Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*, 18(4-5), 839-845.
- Santos, A.S., Duarte, K.R., Pozzib, C.R. (2011). Detecção de Resíduos de Antimicrobianos no Leite. Artigo de Revisão. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, 13(3), 205-12.
- Schencka, F.S., Calleryb P.S. (1998). Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A*, 812(1-2), 99-109.
- Spinosa, H., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. (2006). Antibióticos Bacteriostáticos que Interferem na Síntese Proteica: Macrolídios, Loncosamidas, Pleuromutilinas, Estreptograminas, Tetraciclina, Cloranfenicol e Derivados. In: *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (4ª ed., p. 470). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda.
- Regulamento (CE) nº 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Maio. Prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente activas nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, L152.
- Regulamento (CEE) nº 2377/90 do Conselho, de 26 de Junho de 1990, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal.
- Regulamento (CE) nº 37/2010 da comissão de 22 de Dezembro de 2009, relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, L15 de 20.01.2010, 1-72.
- Rodrigues, AL. (2012). Determinação de tetraciclina em leite por cromatografia de camada fina. *Protocolos, Toxicologia* (3º Ano – 6º Semestre). FMV-ULHT, Lisboa, 2012, p. 7-9.