



Antimicrobianos em Alimentos de Origem Vegetal - Uma Revisão

Patrícia Penido Maia¹, Susanne Rath², Felix G. R. Reyes³

Resumo

Doenças de origem bacteriana em frutas e hortaliças ocorrem no campo ou após a colheita, reduzem a produção e afetam a qualidade do produto para a comercialização e, muitas vezes, causam prejuízos econômicos elevados ao agricultor. O alto teor de água de frutas e hortaliças torna esses vegetais sensíveis ao ataque de bactérias. Para prevenir as perdas econômicas decorrentes de doenças bacterianas em alimentos de origem vegetal, o controle químico é feito com o uso de bactericidas agrícolas como a oxitetraciclina e estreptomicina. Esta revisão tem por objetivo abordar os antimicrobianos permitidos pela legislação brasileira para o uso em lavouras, assim como aspectos de legislação e de métodos analíticos utilizados para avaliação da presença de resíduos dos antimicrobianos em vegetais.

Palavras-chave: antimicrobianos, vegetais, oxitetraciclina, estreptomicina.

Abstract

Bacterial diseases in fruits and vegetables occur in the field or after the harvest, reduce the production and affect the product quality for the commercialization and, many times, cause high economical losses to the agriculturist. The high water content of fruits and vegetables makes these foods sensible to the bacterial attack. To prevent economic losses from bacterial disease in foods of vegetal origin, the chemical control is made with the use of agricultural bactericidal such as oxytetracycline and streptomycin. This paper presents a review about the antimicrobials permitted by the Brazilian legislation to be used in farming, as well as aspects related to the legislation and analytical methods used for the evaluation of the presence of antimicrobial residues in vegetables.

Keywords: antimicrobials, vegetables, oxytetracycline, streptomycin.

¹ Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas - Caixa Postal 6121 - 13083-862 Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas CP 6154 - CEP 13084-971 Campinas, SP, Brasil.

³ Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas - Caixa Postal 6121 - 13083-862 Campinas, SP, Brasil .
e-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br

Introdução

Antimicrobianos são substâncias químicas que combatem ou inibem o crescimento de outros organismos e têm sido utilizados para o controle de certas doenças de origem bacteriana em frutos, vegetais e plantas ornamentais^[1]. O uso de antimicrobianos também é uma importante ferramenta da medicina veterinária para a criação de animais na produção de alimentos. Atualmente, os antimicrobianos são usados para tratar infecções (uso terapêutico), prevenir o aparecimento de infecções (profilático) e melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento)^[2].

A sofisticação da produção agrícola, buscando atender um mercado exigente em produtos de alta qualidade e durante todo o ano, tem aumentado o uso dessas substâncias nas lavouras. No plantio em campo e em ambientes protegidos, face ao problema causado por insetos e ácaros, além de fungos e outros agentes fitopatogênicos como as bactérias, têm-se usado principalmente substâncias químicas para o controle como também para a preservação das colheitas^[3].

Assim, doenças causadas por bactérias tornam-se em geral problema na produção de alimentos. Cada espécie de fruta ou hortaliça é afetada por uma ou mais espécies de bactérias. Em tomates, a mancha bacteriana é causada pela *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; a pinta bacteriana, pela *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; a necrose-da-medula tem como agente causador a *Pseudomonas corrugata*; o talo-oco ou podridão-mole é causado pela *Erwinia spp.* e o cancro bacteriano é uma infecção causada pela *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. O diagnóstico definitivo das bacterioses é baseado nos sintomas distintos no fruto e no isolamento e caracterização do organismo causador^[4,5].

No Quadro 1 são apresentadas algumas das doenças de origem bacteriana que podem ocorrer nas diversas culturas de frutas e hortaliças.

Quadro 1. Doenças de origem bacteriana e agente causador em diversas culturas agrícolas^[3].

Cultura	Doença	Agente causador
ameixa	mancha bacteriana	<i>Xanthomonas pruni</i>
batata	canela preta, podridão mole	<i>Erwinia caratovora</i>
café	mancha aureolada, crestamento bacteriano	<i>Pseudomonas garcae</i>
maracujá	mancha oleosa	<i>Xanthomonas passiflorae</i>
pêssego	mancha bacteriana	<i>Xanthomonas pruni</i>
pimentão	mancha bacteriana	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>

O controle das bacterioses é feito preferencialmente pela combinação de várias medidas de controle incluindo o tratamento das sementes, o uso de antimicrobianos, boas

práticas de manejo, fumigação, desinfecção e rotação de culturas^[3,6].

Os antimicrobianos são mais eficientes quando aplicados preventivamente e devem ser usados quando as condições

ambientais se revelarem favoráveis à ocorrência de doenças bacterianas. Esta eficiência diminui à medida que a doença se instala e as condições climáticas se tornam muito favoráveis à doença. A aplicação de maneira repetida e freqüente leva à seleção e predominância, na população bacteriana, de indivíduos com resistência aos princípios ativos, fazendo com que o produto agrícola perca a eficiência. Estes produtos podem ser usados intercalados ou, em alguns casos, misturados com fungicidas para o controle de doenças fúngicas^[3].

O principal risco à saúde humana decorrente do uso de antibióticos em animais e vegetais é que as bactérias podem desenvolver resistência aos mesmos quer seja por mutação, aquisição de genes ou a combinação de ambos^[7]. Assim, os resíduos de antimicrobianos em alimentos podem expor os consumidores e a população aos riscos conseqüentes da ingestão e do uso indiscriminado destas substâncias. Para reduzir estes riscos é importante realizar o monitoramento dos níveis de resíduos nos alimentos comercializados^[8].

Métodos de análises de resíduos tiveram um enorme avanço no início dos anos 80. Os avanços são notados nos equipamentos analíticos, bem como na parte de aquisição de dados e em todos os estágios do processo analítico. Muitos desses avanços foram, e continuam, dirigidos a um aumento da sensibilidade e seletividade nas técnicas de determinação. Aspectos de regulamentação para o controle de contaminantes químicos em alimentos têm aumentado na última década, devido ao fato de que a implementação das legislações passou a exercer papel importante no comércio internacional de gêneros

alimentícios. Isto levou a um aumento na demanda de métodos analíticos para a detecção de resíduos em alimentos. Para tanto, as técnicas cromatográficas são peças chave, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência. Esta versátil técnica tem sido largamente estudada e é comumente usada na análise de resíduos de antibióticos em amostras biológicas. Ela é capaz de determinar baixos níveis de concentrações, o que é fundamental para a análise de resíduos^[9].

São muitos os estudos encontrados na literatura que descrevem métodos de análise visando a separação, identificação e quantificação de antimicrobianos como as tetraciclinas com o objetivo de monitorar esses resíduos nos vários tipos de alimentos, material biológico e formulações farmacêuticas. Um artigo de revisão de OKA et al.^[9] considera métodos de análise de tetraciclinas incluindo desde a cromatografia em camada delgada, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC). Dentre as várias matrizes apresentadas, estão os alimentos de origem animal como os mais freqüentes objetos de estudo, incluindo entre essas matrizes o leite, ovos, mel, carne, ovos, peixes e camarões, entre outros.

Atualmente, os antimicrobianos mais comumente usados em plantas são a oxitetraciclina (OTC) e a estreptomicina (STP)^[1]. O Brasil permite o uso destes antimicrobianos na agricultura em diversos alimentos de origem vegetal, tais como frutas, hortaliças, cucurbitáceas, raízes e tubérculos. Apesar deste fato, até o momento, não estão disponíveis na literatura métodos de análise

para a determinação de OTC e STP nessas matrizes.

Esta revisão tem por objetivo abordar os antimicrobianos permitidos pela legislação brasileira para o uso em lavouras, a legislação e métodos analíticos que podem ser utilizados para avaliação da presença de resíduos dos antimicrobianos em vegetais, com ênfase nos procedimentos de preparo das amostras para análise por CLAE e EC.

1. Antimicrobianos

1.1 Oxitetraciclina

Os antibióticos do grupo das tetraciclina são produzidos por *Streptomyces* e têm largo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo especialmente efetivos contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Cholera*, *Dysentery bacillus*, *Pertussis*, *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Mycoplasma*. São também efetivas contra alguns anaeróbios e têm sido largamente usadas no tratamento de doenças infecciosas e como fármaco veterinário^[10].

As tetraciclina são ativamente transportadas para o interior das células de bactérias susceptíveis e exercem um efeito bacteriostático pela inibição da biosíntese de proteínas após ligação a subpartícula 30S ribossomal. Desde que a clortetraciclina, primeiro membro da família das tetraciclina, foi isolada em 1948, oito tetraciclina são atualmente disponibilizadas comercialmente, das quais a oxitetraciclina (Figura 1), tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina são comumente aplicadas como medicamento veterinário na produção de alimentos de origem animal, incluindo o mel de abelha, devido ao seu largo espectro e vantagens econômicas^[9].

A oxitetraciclina, [4S - (4 α , 4a α , 5 α , 5a α , 6 β , 12a α) - 4 - (dimetilamino) - 1,4,4a,5,5a,6,11,12a - octaidro - 3,5,6,10,12,12a - hexaidroxi - 6 - metil - 1,11 - dioxo - 2 - naftacenocarboxamida, cuja fórmula molecular é C₂₂H₂₄N₂O₉, tem massa molar de 460,44^[11].

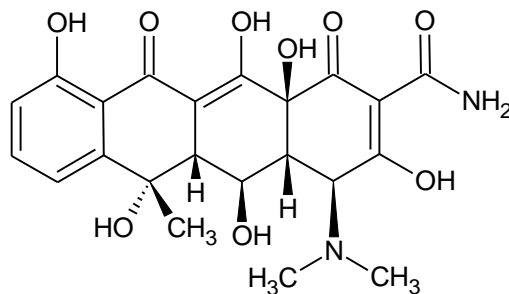


Figura 1 - Estrutura química da oxitetraciclina

As tetraciclina têm propriedades químicas e físico-químicas similares. São compostos anfóteros com valores característicos de pKa e formam hidratos cristalinos e sais com ácidos e bases. Seus

espectros na região do UV mostram fortes absorções em torno de 270 a 360 nm em soluções neutras e ácidas, respectivamente, e são solúveis em ácidos, bases, álcoois e solventes orgânicos apolares e são extraídas

com vários solventes como n-butanol e acetato de etila. A estabilidade das tetraciclinas é baixa sob condições fortemente ácidas e alcalinas e formam epímeros reversíveis. Elas também produzem forte fluorescência com íons metálicos ou sob condições básicas. Formam complexos quelatos com íons metálicos e se ligam com proteínas ou grupos silanóis na fase estacionária de colunas em fase reversa^[12].

A larga utilização das tetraciclinas tem levado a um aumento no fator de resistência ao antimicrobiano, cuja monitorização é requerida pelas agências de saúde pública. Ensaios microbiológicos são comumente utilizados para determinar resíduos de tetraciclinas em alimentos, porém esses métodos consomem muito tempo, e apresentam baixa sensibilidade. Preparações farmacêuticas de tetraciclinas contêm pequenas quantidades de impurezas ou produtos de degradação. No caso da oxitetraciclina, podem estar presentes os seguintes compostos: 4-epioxitetraciclina, anidroxitetraciclina e α - e β -apoxitetraciclina. Estes produtos de degradação podem ocorrer pela dehidrogenação ou epimerização sob as condições de estocagem, devido à baixa estabilidade das tetraciclinas. Por esta razão, métodos validados de análise cromatográfica para as impurezas e produtos de degradação são também necessários^[9].

Na agricultura, a resistência de patógenos de plantas a oxitetraciclina é rara, mas cepas estreptomycin-resistentes de *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp., e *Xanthomonas campestris* têm impedido o controle de várias doenças importantes^[13].

1.2 Estreptomycin

A estreptomycin (Figura 2) pertence à classe de antibióticos conhecidos como

aminoglicosídeos, a qual engloba compostos que exibem atividade contra o crescimento de bactérias aeróbias gram positivas e gram negativas, incluindo a maioria das espécies de *Pseudomonas*. São de baixo custo e potencialmente oto- e nefrotóxicos. Os aminoglicosídeos são antibacterianos cujo efeito primário é a inibição irreversível da síntese protéica bacteriana. O evento inicial da ação de um aminoglicosídeo é a penetração através da parede celular, a qual ocorre por transporte ativo e por difusão passiva. Sua eficácia é dependente da pressão de oxigênio e da existência de um gradiente eletroquímico próprio em cada lado da membrana celular^[14].

A estreptomycin, o composto mais antigo dos aminoglicosídeos, foi primeiramente isolada de *Streptomyces griseus* em 1944. Outros aminoglicosídeos sucederam à estreptomycin como isolados de organismos *Streptomyces* ou como moléculas semi-sintéticas, entre eles, a gentamicina, neomicina, kanamicina A, bekanamicina, butirosina A e B, amicacina, dibecacina, diidroestreptomycin, paromomicina, ribostamicina, sisomicina e tobramicina^[14].

A estreptomycin, O - 2 - deoxi - 2 - (metilamino) - α - L-glucopiranosil - (1->2) - O - 5 - deoxi - 3 - C -formil - α - L-lixofuranosil - (1->4) - N,N'- bis (aminoiminometil) - D - estreptomina, cuja fórmula molecular é (C₂₁H₃₉N₇O₁₂), tem massa molar de 581,58. Os sais de estreptomycin são muito solúveis em água e muito pouco solúveis em álcool, clorofórmio e éter [11].

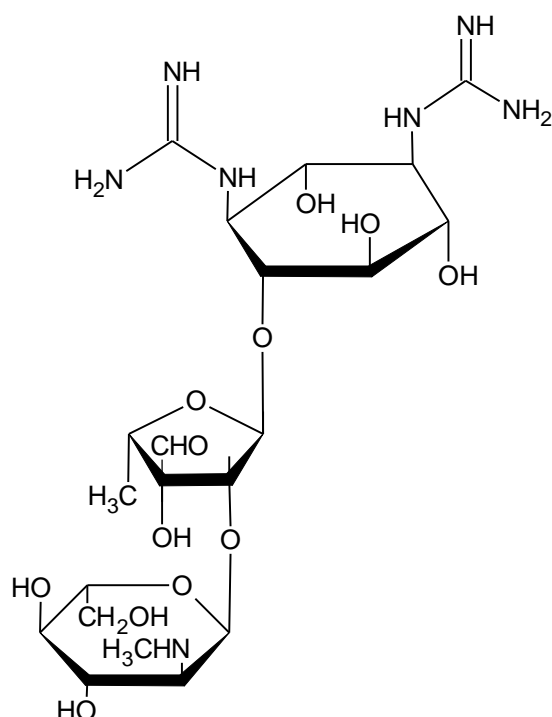


Figura 2 - Estrutura química da estreptomicina

A maioria dos antibióticos interfere com a biosíntese ou função de macromoléculas. Há pelo menos 14 diferentes sistemas bioquímicos propostos como sítios de ação para a estreptomicina. Na presença da estreptomicina, a atividade enzimática da célula microbiana declina. Primeiro uma pequena quantidade da estreptomicina entra em um microrganismo e se liga à proteína S12 da subunidade 30S de um ribossomo. Estudos indicam que o acúmulo da estreptomicina está associado com o mesmo sistema de transporte de elétrons que é normalmente usado como fonte de combustível e carbono. É proposto que a ação da estreptomicina inicia um ciclo de aumento da passagem da estreptomicina em uma célula e um progressivo antagonismo da acetil coenzima A carboxilase até que a lise e morte ocorram^[15].

Como a estreptomicina é também usada como fármaco veterinário, seus resíduos

poderão ser encontrados em carne, fígado, rim, leite e mel. Ainda que a concentração de estreptomicina no alimento não evidencie efeito tóxico agudo, numerosos casos de hipersensibilidade alérgica associada à exposição à estreptomicina foram evidenciados durante os últimos anos, podendo produzir severas erupções na pele. Por essas razões, o controle de resíduos deste antimicrobiano em alimentos torna-se necessário^[16].

A resistência à estreptomicina e a tolerância ao cobre têm dificultado os esforços no controle de doenças bacterianas do tomate nos EUA. Há também estudos para avaliar a extensão da resistência a essas substâncias químicas entre cepas bacterianas nas Repúblicas Tcheca e Eslovaca^[4].

2. Legislação

O risco à saúde humana devido à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos tem sido avaliado pelo Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (*JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives*). Cabe ressaltar ainda, que esse assunto atualmente é objeto de discussão no âmbito do *Codex Alimentarius* e de grupos *ad hoc*, bem como a exposição dos consumidores a resíduos tem sido estimada por meio de estudos da dieta total conduzidos por agências internacionais, tais como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Esses estudos determinam o quanto a população está exposta a certos resíduos em alimentos. Esses dados permitem o cálculo da média de exposição dos consumidores a uma série de substâncias químicas em alimentos e a interpretação dessa média de exposição em termos da ingestão diária aceitável (IDA) para essas substâncias. IDA é uma estimativa da quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente por toda vida sem um risco a saúde apreciável^[17]. Nessas avaliações são levados em consideração todos os dados disponíveis na literatura sobre parâmetros biológicos e toxicológicos do antimicrobiano em questão^[8].

O JECFA, em sua 58^a reunião (1998), estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA de grupo) de 0-0,03 mg/kg de peso corpóreo para a oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina^[18] e, em sua 48^a reunião (1997), estabeleceu uma IDA de grupo de 0-0,05 mg/kg p.c para a estreptomicina e diidroestreptomicina^[19]. Nenhum limite

máximo de resíduo foi recomendado para alimentos de origem vegetal.

De acordo com a Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) limites de tolerância foram estabelecidos para resíduos de oxitetraciclina em frutas como pêssego e pêra os quais foram fixados em 0,35 mg/kg. Em relação à estreptomicina, os valores estabelecidos foram de 0,25 mg/kg para pêra, maçã, batata, aipo, pimenta e tomates^[20].

Segundo a Instrução Normativa nº 42, de 1999, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União (22/12/99), o controle oficial de resíduos de praguicidas em alimentos é geralmente baseado nos limites máximos de resíduos (LMR) ou tolerâncias e intervalos de segurança (períodos de carência), estabelecidos para cada caso. No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos é competência do Ministério da Saúde^[21].

Estudos sobre os efeitos das condições de proteção na produção agrícola, em relação à questão de resíduos nos alimentos, integram as exigências para registro de praguicidas em muitos países, sendo que as condições de condução das culturas protegidas são fatores determinantes na persistência destes resíduos nos produtos agrícolas^[22].

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, Portaria nº 10 (08/03/85) - publicada no Diário Oficial da União (14/03/85)^[1], dentre a relação de substâncias permitidas para uso fitossanitário e domissanitário, constam dois antimicrobianos da Classe Bactericida que têm sua utilização permitida em alimentos de origem vegetal, a oxitetraciclina e a

estreptomicina. Seu emprego é indicado no tratamento de tubérculos e sementes e aplicação em partes aéreas de sementeiras, viveiros em culturas de ameixa, batata, berinjela, café, feijão, fumo, jiló, maracujá, pêssego, pimenta, pimentão, tomate e plantas ornamentais.

O Quadro 2 apresenta os limites máximos de resíduos (LMR) e o intervalo de carência permitido pela legislação brasileira para a oxitetraciclina e a estreptomicina em diversos alimentos de origem vegetal.

Quadro 2. Valores de LMR e intervalo de carência da oxitetraciclina e estreptomicina em diferentes alimentos de origem vegetal estabelecidos pela legislação brasileira ^[1].

Cultura	Oxitetraciclina		Estreptomicina	
	LMR (ppm)	Intervalo de carência (dias)	LMR (ppm)	Intervalo de carência (dias)
Pepino	7	7	0,25	7
Ameixa	0,7	7	0,25	7
Maracujá	< 0,25	7	0,25	7
Berinjela	< 0,25	7	0,25	7
Pêssego	-	-	0,25	14
Jiló	< 0,25	7	0,25	7
Pimenta	< 0,25	7	0,25	7
Pimentão	< 0,25	7	0,25	7
Tomate	< 0,25	7	0,25	14
Batata	< 0,25	7	0,25	7
Feijão	-	-	0,25	7
Café	< 0,25	7	0,25	7

LMR: limite máximo de resíduo.

3. Procedimentos Analíticos

A seguir são abordados os procedimentos analíticos de extração e clarificação do extrato (preparo de amostras), assim como as técnicas de separação e determinação que são utilizadas na determinação de antimicrobianos em diversas matrizes e que podem ser utilizadas em alimentos de origem vegetal.

3.1 Preparo de amostras

Extração em fase sólida

Até recentemente, o procedimento mais utilizado no preparo de amostras complexas anterior à análise cromatográfica

era a extração líquido-líquido (ELL). Essa técnica baseia-se na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis. Em geral, o analito de interesse, juntamente com os interferentes, encontra-se presente em uma matriz líquida, como, por exemplo, a água. Essa solução é colocada em um funil de separação ao qual adiciona-se um solvente orgânico imiscível (na prática pouco miscível) com a água. O sistema é agitado e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto os interferentes permanecem, na sua maioria (idealmente na totalidade) na fase aquosa. Além da ELL, várias outras técnicas têm sido empregadas com intuito semelhante, incluindo a destilação, filtração, centrifugação,

cromatografia líquida preparativa em coluna aberta e outras ^[23].

Em meados da década de 70, uma nova técnica foi introduzida, a qual tem sido denominada extração em fase sólida (SPE). Como o objetivo da extração é o isolamento do analito da maneira mais eficiente possível, o uso da extração em fase sólida foi uma grande inovação e, certamente, uma das poucas ocorridas nos últimos anos, diferentemente do constante desenvolvimento das técnicas de identificação e quantificação. A SPE permite a separação seletiva, a purificação e a concentração de compostos presentes em matrizes complexas, com várias vantagens sobre a tradicional extração líquido-líquido (ELL). Entre elas o uso de pequeno volume de solvente, facilitando o descarte e a evaporação, com evidente proteção ao analista e ao meio ambiente; pouco manuseio da amostra, que passará por etapas de lavagem e eluição na própria coluna; ausência de emulsão, não necessitando agitação da amostra com o solvente; facilidade de automação; baixo consumo de vidraria; menor tempo de análise, obtenção de extratos mais limpos e menor custo de mão-de-obra ^[24].

A extração em fase sólida é um processo físico que envolve uma fase líquida e outra sólida. Esta última tem maior atração pela substância ou grupo de substâncias em estudo do que o solvente no qual está dissolvida. À medida que a amostra passa pela camada de sorvente, o analito se concentra na fase estacionária, enquanto os outros componentes da amostra (interferentes) são eliminados. Nos anos 60 surgiu a idéia de tratar grupos silanol com derivados como mono, di e tri-halo ou alcoxi silila para formar

siloxanos. Embora a idéia original fosse a conversão de sílica não ligada (polar) em sílica ligada (apolar), atualmente ambos os tipos estão disponíveis no mercado ^[25].

Segundo ZIEF & KISER ^[25], as propriedades dos sorventes dependem primariamente do tipo de sílica selecionada. Fases ligadas preparadas com sílica irregular com tamanho médio de partícula de 40 μm , porosidade de 60 Å e área de superfície de 500 m^2/g , fornecem condições ideais de fluxo e pressão. A separação ocorre devido a interações intermoleculares entre o analito e os grupos funcionais do sorvente. Estas interações podem ser apolares, polares ou iônicas. As interações não-polares são aquelas entre os grupos CHn do sorvente e do analito (forças de Van der Waals ou forças de dispersão). Uma vez que a maioria das moléculas orgânicas tem estrutura parcialmente apolar, este tipo de interação é usada para reter o analito no sorvente. A sílica não ligada não sofre interações apolares, ao contrário da ligada, em que a maioria dos grupos funcionais do sorvente estão ligados ao substrato de sílica através de cadeias de carbono de vários comprimentos. Os sorventes mais utilizados neste tipo de interação são octadecila (Si-C18H37), octila (Si-C8H17), cicloexila (Si-C6H11) e fenila (Si-C6H5). Trata-se de sorventes não-seletivos utilizados no caso de amostras contendo compostos de estrutura e propriedades químicas diferentes. Os solventes polares, como a água, facilitam a ligação dos compostos apolares às cadeias de sorvente, enquanto os menos polares, como o clorofórmio, o hexano e o metanol são usados na eluição, sendo capazes de desfazer a interação apolar entre o analito e o sorvente.

Os mecanismos de separação envolvidos em SPE são os mesmos da cromatografia líquida: como consequência, as fases sólidas empregadas são as mesmas utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência. A escolha da fase sólida apropriada depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Os principais mecanismos atualmente em uso são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica, bioafinidade e exclusão por tamanho. As etapas envolvidas na SPE são o condicionamento do cartucho, a adição da amostra, a remoção dos interferentes e a eluição do analito. Pequenas adaptações e modificações podem ser necessárias, dependendo do objetivo do experimento ^[26].

A SPE, em seus vários formatos, tem sido largamente utilizada na determinação de ampla gama de analitos em uma variedade de matrizes em áreas como ambiental, petroquímica, farmacêutica, alimentos, cosméticos, forense, análises clínicas e biológicas. Na análise de alimentos, um expressivo número de compostos têm sido extraídos e purificados através desta técnica, como exemplo compostos responsáveis pelo flavor em manteiga, aminas aromáticas heterocíclicas formadas durante o aquecimento, inseticidas em frutas, lipídeos em cereais, praguicidas em leite e antocianinas de plantas, entre outros ^[27].

3.2 Técnicas de separação

Eletoforese capilar

O fenômeno denominado eletroforese é definido como sendo a migração de espécies carregadas, que ocorre quando as mesmas estão dissolvidas ou suspensas em um

eletrólito, através do qual um potencial elétrico é aplicado ^[28]. Esta técnica de separação foi desenvolvida em 1937 pelo químico Arne Tiselius para o estudo de proteínas em soro, o qual consistia na decomposição do soro sanguíneo em cinco frações protéicas principais ^[29].

A eletroforese capilar (EC) é uma versátil técnica micro/macroanalítica que foi introduzida em 1981 e seu uso tem sido ampliado na separação e determinação de substâncias iônicas e não-iônicas. Em sua forma mais simples, a EC é uma aproximação da técnica original e emprega-se um tubo capilar preenchido com um eletrólito. O mecanismo relativamente simples na separação está relacionado com a velocidade de migração que é baseada no tamanho e carga do analito sob influência de uma voltagem aplicada. A EC tem obtido especial atenção em uma variedade de trabalhos em áreas focadas em moléculas biologicamente ativas, e expandido seu espaço no que diz respeito à instrumentação e aplicação ^[30].

Na década de 1990, a EC teve um grande avanço na pesquisa em química analítica continuando, ainda, a apresentar importantes melhoramentos e desenvolvimentos. Métodos de eletroforese em análises de rotina são aplicados na análise de amostras em indústrias ambientais e têm sido reconhecidos como métodos confiáveis quando comparados aos métodos analíticos tradicionais. Detalhes de métodos registrados são agora incluídos em Farmacopéias e métodos de rotina têm sido submetidos às autoridades regulatórias, como a Agencia de Regulamentação de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (US/FDA).

A EC é rotineiramente utilizada em grande número de aplicações forenses sendo, atualmente, uma ferramenta padrão na caracterização de produtos, como proteínas/peptídeos da indústria biotecnológica, além de análises farmacêuticas, separações quirais (resolução de enantiômeros), separação e determinação de íons metálicos e ânions inorgânicos, aplicações em monitorização ambiental, incluindo fenóis, surfactantes, tintas, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, aminas alifáticas e aromáticas, vitaminas hidro e lipossolúveis, catecolaminas, análises de fármacos e carboidratos e diagnósticos clínicos. Em análises agroquímicas, a aplicação da eletroforese capilar tem mostrado sucesso na determinação de muitos fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas em água, solo e gêneros alimentícios. Resíduos de fármacos, tipicamente antibióticos, em alguns gêneros alimentícios de origem animal têm também sido mensurados por eletroforese capilar, como exemplo a oxitetraciclina em tecido de porco e a enrofloxacin em amostras de frango^[31].

O primeiro estudo com uso de eletroforese capilar na análise de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos utilizou detecção espectrofotométrica indireta, em pH ácido sob condições de polaridade invertida. Os resultados indicaram que uma adequada sensibilidade e seletividade foram obtidas, mas algumas das espécies relatadas não puderam ser separadas. Estudos conduzidos por HOFFSTETTER-KUHN et al.^[32] utilizaram a formação de complexos carregados negativamente entre carboidratos e borato para detecção direta no UV.

Penido et al.^[33] desenvolveram e validaram método para a determinação simultânea de oxitetraciclina e estreptomicina em produtos bactericidas utilizados na agricultura, mediante o uso de EC com detetor de rearranjo de diodos.

Segundo OKA et al.^[9], a eletroforese capilar tem muitas vantagens em comparação a CLAE: redução do uso de solventes, curto tempo na separação, alta eficiência de separação, entre outros. Entretanto, ela tem sido pouco usada em análises de resíduos de fármacos em alimentos, devido ao pequeno volume de injeção da amostra. Apesar desse fato, esses mesmos autores apresentam uma série de estudos para determinação de tetraciclinas em alimentos, preparações farmacêuticas e materiais biológicos.

Vários modos de detecção em EC têm sido propostos. Entre eles estão a absorvância UV/VIS (direta ou indireta), a fluorescência e a detecção eletroquímica. Cada um tem suas distintas vantagens e limitações. Algumas outras abordagens em relação à detecção incluem a fluorescência induzida por laser, detetor de índice de refração e detecção amperométrica por pulsos^[31].

Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi originalmente chamada de cromatografia líquida de alta pressão. Esta última terminologia foi abandonada há muito tempo, quando se constatou que o diferencial de comportamento desta para as demais cromatografias líquidas não era a maior pressão, mas sim o melhor desempenho cromatográfico. Os componentes essenciais deste sistema são uma bomba de alta pressão,

um sistema de injeção da amostra, uma coluna cromatográfica e um detetor^[34].

A CLAE é uma técnica de separação que usa um líquido (fase móvel) para carregar a amostra através de coluna empacotada com um material (fase estacionária). Os compostos presentes nas amostras são separados em função de suas diferentes interações com a fase móvel e a fase estacionária. É uma técnica versátil e muito utilizada na análise de alimentos para quantificação de carboidratos, vitaminas, aditivos, micotoxinas, aminoácidos, proteínas, triglicerídeos em óleos e gorduras, lipídeos, compostos quirais e pigmentos. Entre os detetores mais utilizados nessa técnica estão o detetor de ultra-violeta-visível (UV-VIS), o de fluorescência, o de arranjo de diodos, o eletroquímico e o de índice de refração, bem como o espectrômetro de massa^[35].

Algumas vantagens da CLAE são que o procedimento é simples e razoavelmente rápido; a análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida; não são necessários equipamentos especiais e dispendiosos; são requeridas apenas pequenas quantidades do material, bem como, permite o isolamento de frações isofuncionais para posterior análise e de frações enriquecidas com certos analitos para posterior recristalização, purificação e análise^[34].

É uma técnica que exige conhecimento do efeito das variáveis cromatográficas sobre as interações intermoleculares que conduzem à separação. Nos últimos anos, a aplicação da CLAE tem sido direcionada para o desenvolvimento de métodos mais seletivos que sejam mais

rápidos e possíveis de automatização. A introdução de novos mecanismos de separação como a cromatografia quiral e de imunoafinidade têm contribuído com métodos seletivos para separações complexas. A cromatografia de imunoafinidade possui alta seletividade na separação de compostos que são capazes de formar um complexo com o ligante (imobilizado no suporte cromatográfico), desse modo permitindo determinações seletivas de compostos de elevada massa molar como as proteínas, lipídeos ou polissacarídeos, bem como de componentes de massa molar menores que tenham atividade biológica como hormônios, fármacos, toxinas, etc^[36].

A CLAE tem sido o principal método de detecção e quantificação empregado na determinação de tetraciclinas. Todavia, a presença de um expressivo número de grupos funcionais polares na molécula torna sua análise dificultada, pois eles tendem a interagir fortemente com os grupos silanóis residuais do material de suporte da fase estacionária, mas o uso de colunas de sílica de fase reversa *end-capped* tem minimizado o problema. Para os aminoglicosídeos, a CLAE igualmente tem sido utilizada para sua detecção e também envolve o uso de colunas de fase reversa^[37]. Segundo os mesmos autores^[37], as técnicas de cromatografia líquida apresentam limites de quantificação adequados para a maioria dos antimicrobianos e podem chegar a valores na ordem de 0,3-0,5 µg/mL, sendo que o limite de detecção pode ser diminuído com o uso de detetores fluorimétricos, eletroquímicos e de espectrometria de massas.

A detecção de tetraciclinas é comumente feita em detetor de UV. Todavia,

devido à forte fluorescência por elas produzidas na presença íons metálicos ou sob condições básicas, muitos métodos de análises cromatográficas de tetraciclinas em alimentos têm sido relatados e a detecção em CLAE tem sido feita por detectores de fluorescência [12].

Uma forma de se evitar a formação de complexos quelatos e sua adsorção em colunas de fase reversa é o uso de fase móvel contendo vários ácidos (fosfórico, cítrico, tartárico e EDTA) e cromatografia de par iônico. Entretanto, as tetraciclinas ainda mostram picos com cauda nessas condições, e somente uma fase móvel contendo ácido oxálico foi capaz de reduzir esse problema [9].

A espectrometria de massas também tem sido utilizada como um método sensível de detecção e confirmação de tetraciclinas. As técnicas de ionização aplicadas em análises de alimentos são: *thermospray*, ionização química a pressão atmosférica, *electrospray* e feixe de partículas [38].

Para a determinação de estreptomicina em alimentos de origem animal, EDDER et al. [16] propuseram um método confiável baseado na separação por cromatografia líquida de par iônico com pós-derivatização com β -naftoquinona-4-sulfonato e detecção por fluorescência. A limpeza dos extratos foi feita por extração em fase sólida, inicialmente com coluna de troca catiônica seguidamente de coluna de octadecila.

Métodos alternativos de análises de aminoglicosídeos têm incluído a cromatografia líquida com derivatização pós-coluna ou com detecção eletroquímica, a cromatografia de par

iônico, a eletroforese em gel de agarose, o imunoensaio e a espectrometria de massas [33].

Conclusões

O incremento da produção agrícola nos últimos anos possibilitou que a utilização de antimicrobianos se tornasse uma realidade no Brasil, devido ao fato de algumas culturas serem exigentes no trato fitossanitário pela ocorrência de pragas e doenças durante todo o seu ciclo. Como principais conseqüências desta prática podemos destacar dois aspectos: a problemática mundial relacionada ao desenvolvimento de resistência das bactérias à ação dos antimicrobianos e a presença de resíduos desses compostos nos alimentos comercializados.

A exposição a essas substâncias por meio do consumo de alimentos envolve riscos a saúde do consumidor e informações à população sobre os níveis de resíduos são necessárias para estabelecer os riscos que essas substâncias oferecem. A partir destas informações, medidas de vigilância sanitária poderão ser definidas e adotadas pelas agências governamentais que lidam com saúde pública.

Para tanto, é importante salientar a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que possibilitem a determinação precisa e exata dos possíveis resíduos de antimicrobianos que possam estar presentes nos diversos alimentos, o que aumentaria a confiabilidade nos resultados e, conseqüentemente, a segurança do consumidor.

É crescente o número de artigos publicados nas revistas científicas que

reportam métodos analíticos para a determinação de antimicrobianos de uso veterinário, fato esse que demonstra a preocupação com o assunto. Por outro lado, a mesma importância não tem sido dada ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação dessas substâncias quando empregadas em lavouras, sendo também necessário que ações de vigilância sanitária sejam tomadas para essas matrizes. O emprego dos procedimentos analíticos de extração, bem como das técnicas de separação e determinação como a CLAE e a EC que são utilizados na detecção de antimicrobianos em diversas matrizes biológicas, podem ser utilizadas na validação de métodos para alimentos de origem vegetal.

A partir da validação de metodologias analíticas para a detecção de OTC e STP nas diversas frutas e hortaliças, um controle efetivo ainda no campo e junto aos comerciantes poderia avaliar o nível de resíduos de antimicrobianos nessas matrizes e comparar com os LMR permitidos pela legislação brasileira. A partir destes dados, seria possível verificar se o produtor respeita o intervalo de segurança preconizado pelo fabricante do bactericida agrícola e pelas agências regulatórias.

Referências bibliográficas

[1] Brasil. Ministério da Saúde, Portaria nº 10/SNVS de 08 de março de 1985. Publicada no Diário Oficial da União em 14/03/85 [citado em 2006 nov 30]. Disponível em:

<<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=284&word=>>

[2] OMS. Organização Mundial de Saúde. Report of the Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneve 2003 [citado em 2006 nov 30]. Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/nov2003/en/>>

[3] Lopes CA, Quezado AM. Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle. Brasília: Embrapa-CNPq; 1997.

[4] Pernezny K, Kudela V, Kokoskova B, Hladka I. Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains. *Crop Protection*. 1995; 14:267-270.

[5] Umesha S. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*. 2006; 25:375-381.

[6] Rudakov OL, Rudakov VO. Protection of vegetable crops in greenhouses from root rots and wilts. *Zashchita-i-Karantin-Rastenii*. 2000; 10:27-29.

[7] EMEA - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products / Committee for Veterinary of Medicinal Products (CVMP)/342; 1999.

[8] Neto JP. O uso adequado de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal: aspectos de farmacocinética e de toxicologia; possíveis impactos na qualidade da proteína de origem animal. Seminário - O uso adequado de antimicrobianos como aditivos melhoradores da eficiência alimentar

em animais de produção. São Paulo:SINDAN; 1999. p.20-36.

[9] Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*. 2000; 882:109-133.

[10] Goodman GA, Goodman LS, Rall TW, Murad F. (org.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Mac-Millan; 1985.

[11] Merck Index, 12ed., Rahway; 1996. p.1505, 1197.

[12] Mitscher LA (org.) *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*. NewYork: Marcel Dekker; 1978.

[13] Mcmanus PS, Stockwell VO, Jones AL. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. 2002; 40:443-464.

[14] Bennett CC. The aminoglycosides. *Resistant Competition: 1st Place*. 1996; 6, n.3.

[15] Kornder JD. Streptomycin revisited: molecular action in the microbial cell. *Medical Hypotheses*. 2002; 58:34-36.

[16] Edder P, Cominoli A, Corvi C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1999; 830:345-351.

[17] Niesink RJM, De Vries J, Hollinger MA. *Toxicology. Principles and Applications*. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1996.

[18] OMS. Organização Mundial da Saúde. *Summary of Evaluations Performed by the*

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1998 [citado em 2006 nov 30]. Disponível em:

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1817.htm>

[19] OMS. Organização Mundial da Saúde. *Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1997* [citado em 2006 nov 30]. Disponível em:

<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_2203.htm>

[20] EPA. U.S. Environmental Protection Agency 2005 [citado em 2006 nov 30].

Disponível em:

<http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_05/40cfr180_05.html>

[21] Brasil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 42 de 20 de dezembro de 1999 [citado em 2006 nov 30].

Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16717>>

[22] Trevizan LRP. Resíduos de acefato, de seu metabólito metamidofós e de clorotalonil em cultura protegida de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de campo [tese]. Piracicaba:Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo; 2003. 1-3 p.

- [23] Poole CF, Poole SK. Chromatography today. Elsevier, 1981. Cap. 8 (Sample preparation for Chromatographic Analysis).
- [24] Araujo AC, Salvadori MC. O uso de coluna de fase reversa na extração de fármacos presentes em amostras de urina. *Revista Portuguesa de Farmácia*. 1994; 44:177-182.
- [25] Zief M, Kiser R. Solid phase extraction for sample preparation. Phillisburg: J. T. Baker; 1988. 58p.
- [26] Lanças FM. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: Ri Ma; 2004.
- [27] Ibañez E, Cifuentes A. New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001; 41:413-450.
- [28] Heiger DN. High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E;1997.
- [29] Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*. 1937; 33:524-530.
- [30] Ortega N, Albillos SM, Busto MD. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*. 2003; 14:307-315.
- [31] Altria KD, Elder D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1023:1-14.
- [32] Hoffstetter-kuhn S, Paulus A, Gassmann E, Widmer HM. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1991; 63:1541-1547.
- [33] Penido PM, Amaya-Farfán J, Rath S, Reyes FGR. Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007; 43:450-456.
- [34] Neto FRA, Nunes DSS. *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência; 2003.
- [35] Pará JRJ, Bélanger JMR. *Instrumental Methods in Food Analysis*, Amsterdam: Elsevier; 1997.
- [36] Lacourse WR, Dasenbrock CO. Column liquid chromatography: equipment and instrumentation. *Analytical Chemistry*. 1998; 70:37R-52R.
- [37] Joshi S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002; 28:795-809.
- [38] Nakazawa H, Ino, S, Kato K, Watanabe T, Ito Y, Oka H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 1999; 732:55-64.