

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA O  
CONTROLE DE QUALIDADE E PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS EM  
LEITE BOVINO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS“**

**ANGELA CAVALLINI DE PIETRO\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

**Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass**

**Co-orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\*Bolsista FAPESP**

São Carlos – S.P.  
2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D419dm

De Pietro, Angela Cavallini.

Desenvolvimento de métodos cromatográficos para o controle de qualidade e para a análise de resíduos em leite bovino de medicamentos veterinários / Angela Cavallini De Pietro. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
241 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

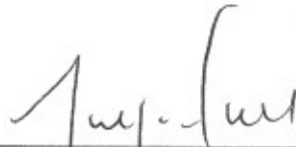
1. Métodos cromatográficos. 2. Controle de qualidade. 3. Análise de resíduos. I. Título.

CDD: 543.089 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Angela Cavallini De Pietro** realizado em 28 de março de 2008:*



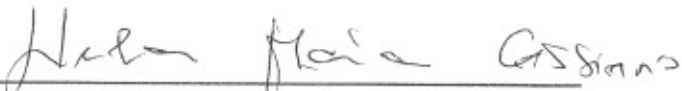
---

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



---

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares



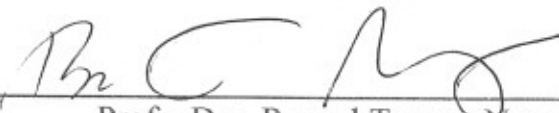
---

Profa. Dra. Neila Maria Cassiano



---

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes



---

Profa. Dra. Raquel Tassara Nogueira

*Dedico esta tese....*

*... aos meus maravilhosos pais, **José Carlos e Solemar**, que compartilharam meus objetivos e sempre os alimentaram, incentivando-me a prosseguir, independente dos obstáculos.*

*... as minhas queridas irmãs, **Giovana e Angélica** e a minha admirável avó, **Yolanda**, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos.*

*... vocês que sempre souberam compreender minha ausência durante essa jornada, dedico esse trabalho com amor, alegria e gratidão.*

.....

Mais que o conhecimento científico, o meu curso de doutorado me proporcionou um crescimento pessoal incrível. Convivi e conheci muitas pessoas, algumas simplesmente iluminadas e inesquecíveis que com certeza deixaram sua marquinha na minha vida. Em tudo, só tenho a agradecer esses 5 anos da minha vida, foi uma fase fundamental para o meu amadurecimento profissional e principalmente pessoal.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass** pela orientação, paciência e pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho** pela co-orientação, e principalmente pela paciência durante o meu processo de aprendizagem sobre espectrometria de massas.

A **todo corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

Aos **todos os professores do Departamento de Química da UFSCar**, em especial aos professores, Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista,

Prof. Dr. João Batista Fernandes e Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pelo empréstimo de materiais e equipamentos.

Ao querido **Sr. Antonio P. Loureiro**, onde quer que o Sr esteja, o meu muito obrigada por todo seu carinho, infinita paciência, ensinamentos e ajuda dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos e colegas adquiridos no grupo de Síntese Orgânica e CLAE: **Airton Vicente Pereira, Bianca Rebelo Lopes (Bibi), Cecília Sumie Fuzita Watanabe, Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso (Carmensita), Fabiana Batigalia, Fernando Campos Costa Rodrigues de Paula (Fezinho Lindo!), Fernando Gonçalves de Almeida (Fer 24), Flávio Luis Beltrame (Flavonóide), Juliana Barrero (Ju), Kátia Roberta Anacleto Belaz (Rozinha), Kenia Lourenço Vanzolini, Lúcia Regina Rocha Martins, Marcela Cristina Moraes, Maria da Paz Nascimento Moreno (Da Paz), Maria Luiza Cruzera Montanari (Malu), Mariana Coimbra (Má), Milena (Baiana), Mirian Cristina Couvre, Profa Dra. Neila Maria Cassiano, Patrícia Polachini (Pati), Profa. Dra. Regina Vincenzi de Oliveira (Re), Ricardo Ferreira Gomes, Thiago Campos Lourenço (Seu Jorge), Túlio Ferreira Galatti (Tutu), Profa. Dra. Vanessa Migliorinni Urban (Van) e Virgínia Verônica de Lima (Vir). Agradeço a todos pela amizade, apoio, incentivo, colaboração e momentos descontraídos durante todos esses anos de convívio.**

Ao **Alexandre Augusto Cruz (Lele)**, por sua amizade, carinho, conselhos, ensinamentos e principalmente pela infinita

disposição e paciência em nos ajudar com os equipamentos. **Lê**, muito obrigada pelas horas extras no laboratório para nos socorrer.

Aos meus amigos **Mariana, Roberta e Fer 24** pela imensa disposição em me ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada também pela companhia, paciência, incentivo, amizade e momentos descontraídos.

Aos meus queridos amigos **Profa Dra. Vanessa Urban, Joel Alvim Jr, Jalusa A. de Leo, Simone Simote, Andréa P. de Oliveira** por todos os momentos de amizade, apoio e alegria que foram muito importantes para conseguir continuar seguindo em frente. A **Tatiane** e em especial a **Viviane Albarici** pelo carinhoso acolhimento na minha reta final, pelo carinho, pelo grande apoio, pela amizade, paciência e pelos momentos de descontração.

A **Profa. Dra Regina Vincenzi Oliveira** pela grande amizade e carinho sincero e principalmente pelos ensinamentos e orientação, conquistados logo no meu estágio de iniciação científica com quem eu tive a grande sorte e o imenso prazer de conviver e aprender cromatografia. **Re**, o meu eterno agradecimento, muito obrigada pela força!

Ao **Fernando Campos Costa Rodrigues de Paula (Fe)** que com sua inteligência e enorme vontade de aprender sempre me incentivou e ensinou muitas coisas; obrigada pela amizade, carinho, companheirismo e principalmente paciência. Obrigada por tornar meus

momentos de dificuldades em momentos menos difíceis, obrigada por me fazer rir..... obrigada por me mostrar o quanto sou capaz.....obrigada pelos conselhos...obrigada pelo seu amor!

A minha família simplesmente espetacular, em especial aos meus maravilhosos pais, **José Carlos De Pietro e Solemar Cavallini De Pietro** por toda dedicação, pelo imenso carinho, pelo apoio, obrigada por acreditarem mim e principalmente obrigada pelo amor incondicional o qual me dá forças para acreditar e enfrentar todos os obstáculos da minha vida. As minhas irmãs **Giovana e Angélica Cavallini De Pietro** que de uma forma ou de outra sempre torceram e torcem por mim. Muito obrigada pelo amor e carinho. As minhas queridas avós **Yolanda Pires Cavallini e Lídia De Pietro** pela imensa torcida, apoio, carinho, amor e conselhos valiosos!

A **FAPESP**, pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!!



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

HFBA	Ácido heptafluorbutírico
PFFPA	Ácido pentafluorpropiónico
TFA	Ácido trifluoracético
LC-MS	Acoplamento das técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massas
ABZ	Albendazol
ABZ-SO	Albendazol-2-Amino-Sulfona
ABZ-SO <sub>2</sub>	Albendazol-Sulfona
ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Albendazol-Sulfóxido
BSA	Albumina Sérica Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
HSA	Albumina Sérica Humana ( <i>Human Serum Albumin</i> )
ADS	Alquil-Diol-Sílica ( <i>Alkyl-Diol-Silica</i> )
r	Coefficiente de Correlação
CV%	Coefficiente de Variação
$\lambda$	Comprimento de onda
CBB	Corante <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LC-LC-MS-MS	Cromatografia líquida multidimensional acoplada a espectrometria de massas “tandem”
d.i.	Diâmetro Interno
HTBA	Dihidrogênio Fosfato de Tetrabutilamônio
ESI	Electrospray
MFP	Fase de Função Mista ( <i>Mixed-Function Phase</i> )
MMP	Fase de Modo Misto ( <i>Mixed-Mode Phase</i> )
IRSP	Fase de Superfície Interna Reversa ( <i>Internal Surface Reversed-Phase</i> )
SHP	Fase Hidrofóbica Blindada ( <i>Shielded Hydrophobic Phase</i> )
RAM-BSA	Fase RAM BSA-Imobilizada
Fenil-BSA	Fase RAM tipo fenil-Sílica BSA-Imobilizada
C <sub>18</sub> -BSA	Fase RAM tipo octadecil-Sílica BSA-Imobilizada
C <sub>8</sub> -BSA	Fase RAM tipo octil-Sílica BSA-Imobilizada
SPS	Fase Semipermeável ( <i>Semi-Permeable Surface</i> )

RAM	Fases de Acesso Restrito ( <i>Restricted-Access Media</i> )
k	Fator de Retenção
FDA	Food and Drug Administration
API	Ionização a pressão atmosférica
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
C <sub>18</sub>	Octadecil-Sílica
C <sub>8</sub>	Octil-Sílica
pI	Ponto Isoelétrico
RID	Refractive Index Detector
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## LISTA DE TABELAS:

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1.1:</b> Classe de medicamentos veterinários/contaminantes autorizados para tratamentos terapêuticos e substâncias não autorizadas, com efeito anabolizante, rigorosamente controladas pela União Européia.....	3
<b>Tabela 1.2:</b> Alterações na composição do leite causadas pela mastite.....	6
<b>Tabela 1.3:</b> Organismos que produzem aminoglicosídeos específicos.....	8
<b>Tabela 1.4:</b> Características físicas e químicas dos antibióticos aminoglicosídeos..	13
<b>Tabela 1.5:</b> Resultado da produção leiteira por animal, de 835 fêmeas tratadas com anti-helmíntico e 835 fêmeas controle tratadas com placebo, durante 220 dias de estudo.....	23
<b>Tabela 1.6:</b> Leite - Produção mundial e dos principais países produtores. ....	31
<b>Tabela 1.7:</b> Leite - Produção destinada à industrialização - Brasil e principais estados (milhões de litros).....	32

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

<b>Tabela 4.8:</b> Propriedades físico-químicas das fases estacionárias utilizadas para a preparação das colunas RAM.....	76
<b>Tabela 4.9:</b> Fases móveis avaliadas para a extração dos antibióticos aminoglicosídeos da coluna RAM-BSA fenil.....	96
<b>Tabela 4.10:</b> Fases móveis avaliadas utilizando as colunas RAM-BSA C <sub>18</sub> e fenil para os antibióticos aminoglicosídeos e detecção por ELSD. ....	101
<b>Tabela 4.11:</b> Valores otimizados do método LC-ELSD para a análise do antibiótico estreptomicina. ....	133
<b>Tabela 4.12:</b> Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise da estreptomicina.....	135

<b>Tabela 4.13:</b> Precisão e exatidão obtidas para a estreptomicina no teste cego (n=3). .....	136
<b>Tabela 4.14:</b> Exatidão, precisão e concentração experimental obtida na análise em triplicata da estreptomicina em medicamentos veterinários de acordo com o método desenvolvido. ....	137
<b>Tabela 4.15:</b> Valores otimizados do método LC-ELSD para a análise dos antibióticos gentamicina e canamicina. ....	142
<b>Tabela 4.16:</b> Concentrações dos componentes da gentamicina. ....	143
<b>Tabela 4.17:</b> Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise dos componentes da gentamicina.....	146
<b>Tabela 4.18:</b> Precisão e exatidão obtidas para a neomicina no teste cego (n=3)..	147
<b>Tabela 4.19:</b> Limites de Quantificação para os componentes da gentamicina. ....	147
<b>Tabela 4.20:</b> Limites de Detecção para os componentes da gentamicina. ....	148
<b>Tabela 4.21:</b> Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise da canamicina. ....	150
<b>Tabela 4.22:</b> Precisão e exatidão obtidas para a estreptomicina no teste cego (n=3). .....	150
<b>Tabela 4.23:</b> Valores de coeficiente linear e angular obtidos para os dois métodos utilizados.....	152
<b>Tabela 4.24:</b> Valores de concentração obtidos para os controles de qualidade dos métodos.....	153
<b>Tabela 4.25:</b> Exatidão, precisão e concentração experimental obtida na análise em triplicata da gentamicina em medicamentos veterinários de acordo com o método desenvolvido. ....	155
<b>Tabela 4.26:</b> Valores otimizados do método LC-ELSD para a análise do antibiótico neomicina. ....	161
<b>Tabela 4.27:</b> Concentrações dos epímeros da neomicina. ....	163

<b>Tabela 4.28:</b> Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise das neomicinas C e B. ....	164
<b>Tabela 4.29:</b> Precisão e exatidão obtidas para a neomicina no teste cego (n=3)..	165
<b>Tabela 4.30:</b> Limites de Quantificação para os componentes da neomicina.....	165
<b>Tabela 4.31:</b> Exatidão, precisão e concentração experimental obtida na análise em duplicata da neomicina em medicamentos veterinários de acordo com o método desenvolvido. ....	166
<b>Tabela 4.32:</b> Condições otimizadas no espectrômetro de massas (analisador tipo ion-trap) para a análise do cefacetil.....	171
<b>Tabela 4.33:</b> Condições otimizadas no espectrômetro de massas (analisador tipo ion-trap) para a análise do cefacetil.....	178
<b>Tabela 4.34:</b> Coeficientes de variação calculados para amostras em solventes e em leite analisadas em triplicata.....	179
<b>Tabela 4.35:</b> Valores de “target” e “max accum. time” avaliados para a cefalexina.....	187
<b>Tabela 4.36:</b> Condições cromatográficas utilizadas, no sistema multidimensional, para a exclusão das macromoléculas e eluição dos analitos na coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e para a análise dos metabólitos do albendazol na coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.). ....	193
<b>Tabela 4.37:</b> Transições selecionada para monitoramento nos experimentos de MRM. ....	197
<b>Tabela 4.38:</b> Condições de ionização otimizadas para a análise do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> – 0 à 10,1 minutos.....	198
<b>Tabela 4.39:</b> Condições de ionização otimizadas para a análise do (±)-ABZ-SO – 10,1 à 15,0 minutos. ....	199
<b>Tabela 4.40:</b> Condições de ionização otimizadas para a análise do ABZ-SO <sub>2</sub> – 15,0 à 20,0 minutos.....	200

<b>Tabela 4.41:</b> Precisão (CV%) dos valores da curva de calibração para a análise de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> (n=3) em leite bovino.....	205
<b>Tabela 4.42:</b> Transições selecionadas para monitoramento nos experimentos de MRM. ....	207
<b>Tabela 4.43:</b> Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdias, para a análise de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> (n=5) em leite bovino.....	211
<b>Tabela 4.44:</b> Precisão e exatidão obtidas no teste cego de ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de leite bovino (n=3). ....	212
<b>Tabela 4.45:</b> Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> (n=5) .....	213
<b>Tabela 4.46:</b> ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de leite bovino (n=3). ....	213
<b>Tabela 4.47:</b> Resultados do estudo de estabilidade a ciclos de degelo para o ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> em amostras de leite bovino (n=3). ....	215
<b>Tabela 4.48:</b> Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de leite, fortificadas com ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> , armazenadas a -20°C. ....	217

## LISTA DE FIGURAS:

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1.1:</b> Estrutura química característica dos antibióticos aminoglicosídeos.....	9
<b>Figura 1.2:</b> Estrutura química dos antibióticos aminoglicosídeos (Continua). ....	10
<b>Figura 1.3 –</b> Núcleo das cefalosporinas (A) e das penicilinas (B).....	17
<b>Figura 1.4:</b> Precursores das penicilinas e cefalosporinas. <sup>41</sup> .....	17
<b>Figura 1.5:</b> Estrutura química da cefalosporina C. <sup>41</sup> .....	18
<b>Figura 1.6:</b> Estrutura química de alguns antibióticos cefalosporínicos. ....	19
<b>Figura 1.7:</b> Sítios de ionização do núcleo cefano.....	19
<b>Figura 1.8:</b> Principais anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária. <sup>1</sup> .....	24
<b>Figura 1.9:</b> Ionização do núcleo imidazólico sobre condições ácidas (A) e básicas (B).....	25
<b>Figura 1.10:</b> Metabólitos majoritários do albendazol.....	27
<b>Figura 1.11:</b> Classificação das fases RAM. <sup>106</sup> .....	37
<b>Figura 1.12:</b> Representação esquemática das fases de acesso restrito bimodal. <sup>115</sup>	38
<b>Figura 1.13:</b> Representação esquemática das fases de acesso restrito unimodal. <sup>115</sup> .....	38
<b>Figura 1.14:</b> Mecanismo de funcionamento da técnica ESI. <sup>132</sup> .....	43
<b>Figura 1.15:</b> Representação esquemática de uma interface do tipo APCI no sistema MS. ....	45
<b>Figura 1.16:</b> Variação no número de publicações com o uso do ELSD. <sup>30</sup> .....	47
<b>Figura 1.17:</b> Princípio do detector de espalhamento de luz. Adaptado <sup>30</sup> .....	48
<b>Figura 4.18:</b> Fases hidrofóbicas imobilizadas com proteína; C <sub>18</sub> : octadecilsílica; NH <sub>2</sub> : aminopropilsílica; BSA: albumina sérica bovina. ....	74
<b>Figura 4.19:</b> Esquema representativo das etapas envolvidas na preparação das colunas RAM-BSA. <sup>106</sup> .....	75

<b>Figura 4.20:</b> Reações envolvidas na estabilização da BSA imobilizada em fases hidrofóbicas. <sup>106</sup> .....	77
<b>Figura 4.21:</b> Uma das estruturas de ressonância do corante Coomassie Brilliant Blue (CBBG-250). .....	78
<b>Figura 4.22:</b> Procedimento realizado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do leite bovino pelas colunas RAM-BSA. Adaptado da referência 106..	79
<b>Figura 4.23:</b> Espectro do corante “Coomassie Brilliant Blue” .....	80
<b>Figura 4.24:</b> Espectros obtidos: Azul (a) - amostra padrão; Vermelho (b) - corante-proteína da primeira fração (2 min) de leite eluído da coluna extratora C <sub>18</sub> ; Azul (c) - reagente; Amarelo (d) - corante-proteína da segunda fração (4 min) de leite eluído da coluna extratora C <sub>18</sub> . .....	81
<b>Figura 4.25:</b> Porcentagem de proteínas excluídas pelas colunas RAM-BSA C <sub>18</sub> e amino. ....	82
<b>Figura 4.26:</b> Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando as colunas RAM-BSA Amino e C <sub>18</sub> . Condições Cromatográficas: Fase Móvel: H <sub>2</sub> O; vazão: 1,0 mL/min; $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L. ....	83
<b>Figura 4.27:</b> Perfil de exclusão das macromoléculas das amostras de leite utilizando as colunas RAM-BSA Amino e C <sub>18</sub> . Condições Cromatográficas: Fase Móvel: NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH = 6,5); vazão: 1,0 mL/min; $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L. ....	86
<b>Figura 4.28:</b> Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando a coluna amino-BSA para as soluções de acetato de amônio e fosfato de potássio (0,01M, pH=6,5). Condições cromatogáficas: vazão: 1,0 mL/min; $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L. ....	87
<b>Figura 4.29:</b> Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando a coluna C <sub>18</sub> -BSA para as soluções de acetato de amônio e fosfato de potássio (0,01M, pH=6,5).	



Condições cromatográficas: Vazão: 1,0 mL/min; $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L. ....	88
<b>Figura 4.30</b> - Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando a coluna fenil BSA para as soluções acetato e fosfato (0,01M, pH=6,5) e para água. Condições cromatográficas: Vazão: 1,0 mL/min; $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200 $\mu$ L.....	89
<b>Figura 4.31</b> – Análise da amostra de neomicina (50 $\mu$ g/mL) em solução aquosa utilizando a coluna BSA-C <sub>18</sub> . Condições Cromatográficas: Fase Móvel: NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH = 6,5) / CH <sub>3</sub> CN (98:02); vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 100 $\mu$ L; Detecção: RID.....	92
<b>Figura 4.32</b> - Cromatograma de análise da gentamicina (100 $\mu$ g/mL) utilizando a coluna RAM-BSA C <sub>18</sub> . Condições cromatográficas: FM: NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> CN (90:10); Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 100 $\mu$ L; Detecção: RID.....	94
<b>Figura 4.33</b> - Cromatogramas de análise dos antibióticos aminoglicosídeos (2 mg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: FM: TFA (0,1M, pH=1,2); Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 50 $\mu$ L, Detecção: RID.....	98
<b>Figura 4.34</b> - Cromatogramas de análise da gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> Hypersil (15 x 0.46 cm d.i.). Condições cromatográficas: FM: <b>A</b> -TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (99:01), <b>B</b> - TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (97:03), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 50 $\mu$ L, Detecção: RID. ....	99
Figura 4.35 - Cromatograma de análise da gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: FM: TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (97:03), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 50 $\mu$ L Condições do detector de espalhamento de luz: Vazão do gás: 1,6 L/min; Temperatura: 70°C.....	100

**Figura 4.36** – Cromatogramas de análise da Neomicina e Estreptomicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-BSA (Hypersil 10x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01, 0,05 e 0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. .... 104

**Figura 4.37** – Cromatogramas de análise da Gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-BSA (Hypersil 10x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01, 0,05 e 0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off..... 104

**Figura 4.38** – Cromatogramas de análise das amostras de estreptomicina, gentamicina e neomicina (1,0 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-ADS (2,5 x 0,40 cm d.i.; 25 µm, 60 Å). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005 e 0,1 M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 103,4 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. .... 107

**Figura 4.39** – Cromatogramas de análise das amostras de neomicina, gentamicina, estreptomicina e do sulfato de amônio (1,0 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-ADS (2,5 x 0,40 cm d.i.; 25 µm, 60 Å). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 103,4 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. .... 109

**Figura 4.40:** Interações entre o soluto catiônico A<sup>+</sup> e a fase estacionária de sílica de acordo com os mecanismos: (A) formação do par iônico na fase móvel e (B) troca iônica dinâmica na fase estacionária, na presença do aditivo X<sup>-</sup>C<sup>+</sup> na fase móvel. .... 111

<b>Figura 4.41:</b> Mecanismo de retenção para a gentamicina usando ácidos fluorinados como agente de pareamento iônico.....	113
<b>Figura 4.42:</b> Influência da concentração de TFA no fator de retenção (k) dos antibióticos neomicina e estreptomicina.....	115
<b>Figura 4.43:</b> Influência da concentração de TFA no fator de retenção (k) do antibiótico gentamicina. ....	116
<b>Figura 4.44:</b> Cromatogramas de análise da Gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01, 0,05, 0,08 e 0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.....	116
<b>Figura 4.45</b> – Cromatograma de análise da Gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA 0,05M, Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.....	117
<b>Figura 4.46</b> – Cromatogramas de análise das amostras de gentamicina, neomicina e estreptomicina (1 mg/mL) utilizando a coluna Fenil (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01 M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. ....	119
<b>Figura 4.47</b> – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina utilizando as Colunas Fenil e C <sub>18</sub> (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01 M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C , Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. ....	120

<b>Figura 4.48</b> – Influência da concentração de HFBA no fator de retenção (k) dos antibióticos neomicina, gentamicina e estreptomicina. ....	122
<b>Figura 4.49</b> – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina, utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/HFBA (0,01, 0,05, 0,08 e 0,1M) (60:40), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 94,3 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 2,5 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. ...	123
<b>Figura 4.50</b> – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina utilizando a coluna Fenil (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/HFBA (0,01, 0,05, 0,08 e 0,1M) (60:40), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 94,3 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 2,5 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off. ...	124
<b>Figura 4.51</b> – Influência da concentração de PFPA no fator de retenção (k) dos antibióticos estreptomicina, gentamicina e neomicina. ....	127
<b>Figura 4.52</b> – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina, utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,46 cm d.i.). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/PFPA (0,01 e 0,1M) (1:1), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 87,5 °C, Vazão do gás (ar comprimido): 2,6 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off. ....	128
<b>Figura 4.53</b> – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina utilizando a coluna Fenil (Hypersil 15 x 0,46 cm d.i.). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/PFPA (0,01 e 0,1M) (1:1), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 87,5 °C, Vazão do gás (ar comprimido): 2,6 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off. ....	129
<b>Figura 4.54:</b> Estrutura química da estreptomicina. ....	131
<b>Figura 4.55</b> – Cromatogramas de análise de uma amostra de estreptomicina (500 µg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10 µm).	

Condições cromatográficas: FM: <b>A)</b> TFA 0,05M e <b>B)</b> TFA (0,05M)/MeOH (99:01 v/v); Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. ....	132
<b>Figura 4.56:</b> Cromatograma típico obtido da análise da estreptomicina na concentração de 0,35 mg/mL durante a validação do método.....	134
<b>Figura 4.57:</b> Curva de Calibração obtida para a estreptomicina.....	135
<b>Figura 4.58</b> – Estrutura química dos componentes da gentamicina.....	138
<b>Figura 4.59:</b> Cromatogramas de análise da gentamicina (50 µg/mL) utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10 µm). Condições cromatográficas: A: TFA (0,05M)/CH <sub>3</sub> CN (95:05), B: TFA (0,05M)/CH <sub>3</sub> CN (96:04) e C: TFA (0,05M)/CH <sub>3</sub> CN (97:03). Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do ELSD: Temperatuta do tubo: 113,6 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off.....	141
<b>Figura 4.60</b> – Curvas de calibração obtida para os componentes da gentamicina. ....	144
<b>Figura 4.61:</b> Curva de calibração obtida para a canamicina.....	149
<b>Figura 4.62:</b> Estrutura química da neomicina. ....	156
<b>Figura 4.63:</b> Cromatograma de análise da neomicina utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10 µm). Condições cromatográficas: TFA (0,05M). Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do ELSD: Temperatuta do tubo: 107,0 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off.....	157
<b>Figura 4.64:</b> Espectro de massa da amostra de neomicina. ....	158
<b>Figura 4.65:</b> Cromatograma de análise da neomicina utilizando a coluna C <sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10 µm). Condições cromatográficas: TFA (0,05M). Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do MS: Modo de análise: SIM; Analisador: Ion-trap.....	159
<b>Figura 4.66:</b> Experimento de LC-MS de íons fragmentos. ....	160

<b>Figura 4.67:</b> Cromatograma típico obtido da análise da neomicina na concentração de 0,35 mg/mL total, durante a validação do método. ....	162
<b>Figura 4.68:</b> Curvas de Calibração obtidas para as neomicinas C e B. ....	163
<b>Figura 4.69:</b> Estrutura química do Cefacetil.....	168
<b>Figura 4.70:</b> Cromatograma comparativo do cefacetil (50 µg/mL) utilizando a coluna C <sub>8</sub> – BSA (5 x 0,46 cm d.i) (120Å, 10µm). FM: NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH 7,5) e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,01M, pH 7,5), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 50 uL, λ = 270 nm. ....	169
<b>Figura 4.71:</b> Espectro de massas do cefacetil na fase móvel NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH 7,5)/CH <sub>3</sub> CN (95:05). ....	170
<b>Figura 4.72:</b> Espectros de íons fragmentos dos íons <i>m/z</i> 357,2 e 362,2 na fase móvel NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH 7,5)/CH <sub>3</sub> CN (95:05). Amplitude de fragmentação: A: 0,20 e B: 0,25 .....	173
<b>Figura 4.73:</b> Proposta de fragmentação do aduto de sódio do cefacetil de acordo com o espectro de íons fragmentos obtidos. ....	174
<b>Figura 4.74:</b> Proposta de fragmentação do aduto de amônio do cefacetil de acordo com o espectro de íons fragmentos obtidos. ....	175
<b>Figura 4.75:</b> Cromatogramas de análise do cefacetil (500 µg/mL) utilizando a coluna RAM-BSA C <sub>8</sub> (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10 µm). <b>A:</b> Full scan e <b>B:</b> MRM das transições <i>m/z</i> 362 → <i>m/z</i> 177 e <i>m/z</i> 362 → <i>m/z</i> 258. FM: NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH 7,5) até 7 minutos e NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH 7,5)/CH <sub>3</sub> CN (95:05). Condições para o MRM: Inter Channel Delay: 0,03 secs; Span: 1 <i>m/z</i> ; Dwell Time 0,08 secs. ....	176
<b>Figura 4.76:</b> Cromatogramas de MRM de análise do cefacetil (40 ng/mL) utilizando a coluna RAM-BSA C <sub>8</sub> (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10 µm). Transição <i>m/z</i> 357,2 → <i>m/z</i> 280,2 <b>A:</b> Solvente e <b>B:</b> Leite. <b>FM:</b> NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH= 7,5) até 7 minutos; NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH= 7,5)/CH <sub>3</sub> CN (95:05 v/v) até 12 minutos. Amplitude de fragmentação: 0,20. ....	177

<b>Figura 4.77:</b> Sistema de infusão pós sistema cromatográfico da solução de NH <sub>4</sub> Ac 0,05M.....	179
<b>Figura 4.78</b> – Cromatogramas de MRM de análise do cefacetil (50 ng/mL) utilizando a coluna RAM-BSA C <sub>8</sub> (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10 μm) – <b>A</b> : em solvente e <b>B</b> : em leite. Transição <i>m/z</i> 357,2 → <i>m/z</i> 280,2. FM: NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH= 7,5) até 7 minutos; NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH= 7,5)/CH <sub>3</sub> CN (93:07 v/v) até 12 minutos. Amplitude de fragmentação: 0,20. ....	180
<b>Figura 4.79:</b> Estrutura química da cefalexina. ....	181
<b>Figura 4.80</b> – Cromatograma do íon extraído <i>m/z</i> 348, para comparação da corrente iônica gerada para a cefalexina com a utilização de diferentes modificadores orgânicos. ....	182
<b>Figura 4.81:</b> Espectro de massa e de íons fragmentos gerados para a cefalexina. ....	183
<b>Figura 4.82:</b> Representação esquemática do sistema de cromatografia multidimensional utilizado. <sup>115</sup> ....	184
<b>Figura 4.83</b> – Cromatograma de análise de uma amostra de cefalexina 100 ng/mL em solvente. ....	186
<b>Figura 4.84</b> – Cromatogramas de análise da cefalexina preparada em solvente e em leite com uso do agente de pareamento iônico HTBA, monitorados com os detectores de UV e MS.....	188
<b>Figura 4.85</b> – Cromatogramas de análise da cefalexina (100 μg/mL) em leite utilizando a coluna C <sub>18</sub> – BSA (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10μm) e C <sub>18</sub> -Hypersil (5 × 0,46 cm d.i.) (120Å, 10μm), com detecção por MS. Condições cromatográficas: Linha (A): NH <sub>4</sub> Ac 0,01 mol/L (pH 7,5) – 5 minutos para exclusão protéica; Linha (B): NH <sub>4</sub> Ac 0,01 mol/L (pH 7,5): CH <sub>3</sub> CN (90:10 v/v) para transferência e análise da cefalexina na coluna analítica; e Linha (C): NH <sub>4</sub> Ac 0,01 mol/L (pH 7,5): CH <sub>3</sub> CN (50:50 v/v) para limpeza da coluna RAM-BSA.....	190

<b>Figura 4.86:</b> Espectros de massa e de íons fragmentos dos metabólitos ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO.....	194
<b>Figura 4.87:</b> Cromatograma de análise dos metabólitos (1) ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (9,0 ng/mL); (2) R-(+)-ABZ-SO (27 ng/mL); (3) S-(-)-ABZ-SO (27 ng/mL) e (4) ABZ-SO <sub>2</sub> .ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (27 ng/mL) em leite bovino utilizando as colunas RAM-C <sub>8</sub> -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.), com detecção por MS. Bomba 1 (A) água 100%; (B) água:CH <sub>3</sub> CN (60:40) e (C): CH <sub>3</sub> CN /água/ISO (75:15:10); vazão de 1,0 mL/min. Bomba 2 (D): água:CH <sub>3</sub> CN (60:40); vazão de 0,8 mL/min; volume de injeção: 100 µL. ....	201
<b>Figura 4.88:</b> Representação esquemática do sistema utilizado para o estudo de efeito de matriz. ....	203
<b>Figura 4.89:</b> Cromatogramas representativos do estudo de efeito de matriz. (----) – leite integral; (----) – leite desnatado; (----) – água e (----) – efeito da válvula de acoplamento. ....	204
<b>Figura 4.90:</b> Curvas analíticas para o ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO <sub>2</sub> . ....	209



## RESUMO

“Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos para o Controle de Qualidade e para a Análise de Resíduos em Leite Bovino de medicamentos Veterinários”.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e avaliação de colunas RAM-BSA na exclusão de proteínas do leite bovino e da capacidade de retenção dessas colunas para os antibióticos aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina). O perfil cromatográfico da exclusão das proteínas foi avaliado utilizando água, solução fosfato de potássio dibásico e solução acetato de amônio como fase móvel. A capacidade de retenção das colunas RAM-BSA para os antibióticos aminoglicosídeos foi avaliada utilizando cromatografia no modo reverso de eluição, com o uso de soluções tamponadas, e cromatografia de pareamento iônico. Foi verificado, com todas as fases móveis avaliadas, uma grande variação nos tempos de retenção dos analitos. Uma coluna RAM-ADS foi também utilizada e, da mesma forma que as colunas RAM-BSA nenhum tempo de retenção adequado foi obtido. Durante o estudo de retenção nas colunas RAM-BSA foi também realizada, uma avaliação do fator de retenção (k) dos antibióticos aminoglicosídeos utilizando cromatografia de pareamento iônico (TFA, HFBA e PFFA como agentes de pareamento iônico) nas colunas fenil e C<sub>18</sub> (Hyperil 15 x 0,46 cm d.i.) e ELSD como detector. Esse estudo proporcionou o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade de medicamentos veterinários. Foram desenvolvidos métodos de análise para os três antibióticos avaliados e os métodos apresentaram linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão adequadas, de modo que foram aplicados com sucesso na análise de medicamentos veterinários comerciais.

Este trabalho também apresenta um estudo para o desenvolvimento de um método por injeção direta utilizando colunas RAM-BSA para análise de

antibióticos cefalosporínicos em leite bovino com detecção por espectrometria de massa. As propriedades físico-químicas destes compostos exigiram a utilização de soluções tamponadas e agentes de pareamento iônico, os quais dificultaram o acoplamento com o MS influenciando diretamente na ionização destes compostos, impedindo o desenvolvimento do método.

O desenvolvimento e validação de um método, sensível e enantiosseletivo por CLAE-multidimensional para a determinação dos metabólitos do albendazol (albendazol-sulfóxido, albendazol-sulfona e albendazol-2-amino-sulfona) em leite bovino por detecção por MS também foi realizado. Uma coluna RAM-BSA C<sub>8</sub> (5,0 x 0,46 cm d.i.) foi acoplada em uma coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica APS-Nucleosil (15,0 x 0,46 cm d.i.) e o método validado mostrou linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade adequada para ser utilizado em estudos de resíduos em alimentos e/ou farmacocinéticos destes compostos. Ainda, durante este trabalho foi realizado um estudo do efeito de matriz para verificar a influência desta na validação do método por LC-MS.

## ABSTRACT

“Development of chromatographic methods for quality control and residual limits analysis of veterinary pharmaceutical formulations in bovine milk”.

This work reports the investigation of a series of bovine serum albumin (BSA) restricted access media columns (RAM) for on-line milk samples deproteinization using water, phosphate and acetate buffer as mobile phase. The retention factor ( $k$ ) of aminoglycosides antibiotics (streptomycin, neomycin and gentamycin) on the RAM columns was evaluated using buffers and ion pair chromatography. The results showed a wide variation on aminoglycosides antibiotics retentions time; a RAM-ADS column was also investigated and the same results was observed.

During the RAM columns studies, an investigation of two analytical columns, C<sub>18</sub> and phenyl (Hyperil 15 x 0,46 cm i.d.), were performed using ion pair chromatography. Perfluorinated acids (TFA, HFBA and PFPA) were evaluated as mobile phase and the detection was accomplished by an evaporative light scattering detector (ELSD). This study allowed the development of analytical methods for quality control of gentamycin, neomycin and streptomycin in veterinary pharmaceutical formulations. The developed methods showed good selectivity, sensibility, accuracy and precision for all compounds allowing it to be successfully used to commercial formulations.

This work also presents a study for on line determination of cephalosporinic antibiotics in bovine milk by multidimensional chromatography using RAM-BSA column for sample clean-up. The chromatographic conditions optimized for these compounds were not adequate for the MS/MS quantification due to suppression and/or enhancement of compound's ionization.

Still a sensitive and enantioselective multidimensional high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of albendazole metabolites: albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and albendazole 2-aminesulphone in bovine milk was development and validated at this work. The compounds, ( $\pm$ )-albendazole sulphoxide, albendazole sulphone and 2-aminesulphone were extracted from bovine milk using a octyl restricted access media bovine serum albumin column (C<sub>8</sub>-RAM-BSA) (5.0 x 0.46 cm i.d.) and analyzed on a chiral column containing amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated onto APS-Nucleosil support, as stationary phase (15.0 x 0.46 cm i.d.). The validated method showed linearity, precision, accuracy and adequate sensitivity, allowing it to be appropriate for pharmacokinetics studies and residual limits control. A matrix effect study was conducted to investigated its influence on the LC-MS method development.

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS E A PECUÁRIA MODERNA	1
1.1.1 – ANTIBIÓTICOS	3
1.1.1.1 – AMINOGLICOSÍDEOS .....	6
1.1.1.1.1 – HISTÓRIA, ORIGEM E ATIVIDADE BACTERICIDA	6
1.1.1.1.2 – CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E CARACTERÍSTICA QUÍMICA	8
1.1.1.1.3 – MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS	12
1.1.1.2 – ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS .....	16
1.1.1.2.1 – CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E CARACTERÍSTICA QUÍMICA	16
1.1.1.2.2 – APRESENTAÇÃO DOS MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS CEFALOSPORÍNICOS	20
1.1.2 - ANTI-HELMÍNTICOS	21
1.1.2.1 – ANTI-HELMINTICOS BENZIMIDAZÓLICOS.....	24
1.1.2.2 – MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE ALBENDAZOL E SEUS METABÓLITOS .....	28
1.2 – LEITE BOVINO: COMPOSIÇÃO, IMPORTANCIA ECONOMICA E NUTRICIONAL	30
1.3 – PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	33
1.3.1 – FASES DE ACESSO RESTRITO (RAM)	35
1.4 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESPALHAMENTO DE LUZ COMO DETECTORES NA ANÁLISE DE FÁRMACOS E METABÓLITOS POR CLAE	41
1.4.1 – LC-MS/MS	41
1.4.2 – LC - ELSD	46
2 – OBJETIVOS .....	49
3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	50
3.1 – GENERALIDADES	50

3.2 – PREPARO DAS COLUNAS RAM-BSA	53
3.2.1 – SÍLICAS UTILIZADAS	53
3.2.2 – EMPACOTAMENTO DAS COLUNAS	53
3.2.3 - IMOBILIZAÇÃO DAS FASES HIDROFÓBICAS COM BSA	53
3.3 – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXCLUSÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE BOVINO PELAS COLUNAS RAM-BSA – MÉTODO DE BRADFORD <sup>142</sup>	54
3.3.1 – PREPARO DO REAGENTE DE BRADFORD	54
3.3.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS	54
3.3.3 – DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS	55
3.4 - AVALIAÇÃO DO PODER DE RETENÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS PELAS COLUNAS RAM-BSA, ADS, FENIL E C <sub>18</sub>	56
3.4.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO E ACETATO DE AMÔNIO (0,01M); DOS ÁCIDOS TRIFLUORACÉTICO, HEPTAFLUORBUTÍRICO E PENTAFLUORPROPIÔNICO (0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,08 E 0,1M) E DA SOLUÇÃO DE TETRABUTILAMÔNIO 2MM	56
3.4.1.1 – SOLUÇÃO ACETATO DE AMÔNIO (0,01M).....	56
3.4.1.2 – SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO (0,01M).....	56
3.4.1.3 – SOLUÇÃO DE TETRABUTILAMÔNIO (2 mM).....	57
3.4.1.4 – SOLUÇÃO DE TFA (0,005; 0,01; 0,05; 0,08 E 0,1M) .....	57
3.4.1.5 – SOLUÇÃO DE HFBA (0,005; 0,01; 0,05; 0,08 E 0,1M) .....	57
3.4.1.6 – SOLUÇÃO DE PFPA (0,01; 0,025; 0,05; 0,075 E 0,1M) .....	58
3.4.2 – SOLUÇÕES PADRÃO	58
3.4.2.1 – AMINOGLICOSÍDEOS.....	58
3.4.2.2 – CEFACETRIL.....	59
3.5 – MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICO	59
3.5.1 – EMPACOTAMENTO DAS FASES ESTACIONÁRIAS	59
3.5.1.1 – COLUNAS AQUIRAIAS (C <sub>18</sub> e fenil).....	59

3.5.1.2 – COLUNA QUIRAL .....	59
3.5.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS	60
3.5.2.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO.....	60
3.5.2.1.1 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO ESTREPTOMICINA	60
3.5.2.1.2 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO NEOMICINA	61
3.5.2.1.3 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO GENTAMICINA	61
3.5.2.1.4 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO CANAMICINA	62
3.5.2.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE.....	63
3.5.2.2.1 – MÉTODOS ESTREPTOMICINA, NEOMICINA, GENTAMICINA E CANAMICINA	63
3.5.2.3 – OBTENÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS .....	63
3.5.2.4 – PARÂMETROS ANALÍTICOS AVALIADOS .....	64
3.5.2.4.1 – LINEARIDADE	64
3.5.2.4.2 – PRECISÃO E EXATIDÃO	64
3.5.2.4.3 – LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DETECÇÃO (LD)	65
3.5.3 – MÉTODO BIOANALÍTICO	65
3.5.3.1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DO ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> E (±)- ABZ-SO .....	65
3.5.3.2 - PREPARO DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE.....	66
3.5.3.3 – OBTENÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS .....	67

3.5.3.4 - PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS	68
3.5.3.4.1 - SELETIVIDADE	68
3.5.3.4.2 - EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (RECUPERAÇÃO) E TRANSFERÊNCIA DOS ANALITOS	69
3.5.3.4.3 - PRECISÃO E EXATIDÃO	69
3.5.3.4.4 - LIMITE DA QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DETECÇÃO (LD)	69
3.5.3.4.5 – ESTUDOS DE ESTABILIDADE	70
3.5.3.4.5.2 - ESTABILIDADES APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DEGELO	70
3.5.3.4.5.3 - ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO	71
3.5.3.4.5.4 - ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO	71
3.5.3.4.5.5 - ESTABILIDADES DAS AMOSTRAS DURANTE A PERMANÊNCIA NO AUTO-INJETOR	71
3.6 – ESTUDO DO EFEITO DA MATRIZ	71
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE COLUNAS RAM-BSA	73
4.1.1 - PREPARO DAS COLUNAS DE FASE HIDROFÓBICA IMOBILIZADAS COM PROTEÍNA	73
4.1.2 – AVALIAÇÃO DO PODER DE EXCLUSÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE PELAS COLUNAS RAM-BSA	77
4.1.3 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS PELAS COLUNAS RAM-BSA	90
4.1.4 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO A COLUNA DE FASE DE ACESSO RESTRITO ADS E TFA COMO AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO COM DETECÇÃO POR ELSD	106



4.2 – AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO (K) PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE PAREAMENTO IÔNICO E DETECÇÃO POR ELSD	109
4.2.1 – AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO O AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO TFA NAS COLUNAS C <sub>18</sub> E FENIL	114
4.2.2 - AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO O AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO HFBA NAS COLUNAS C <sub>18</sub> E FENIL	121
4.2.3 - AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO O AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO PFPA NAS COLUNAS C <sub>18</sub> E FENIL	125
4.3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	130
4.3.1. - QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ESTREPTOMICINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	131
4.3.1.1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	132
4.3.1.2 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DE ESTREPTOMICINA.....	136
4.3.2 - QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO GENTAMICINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	137
4.3.2.1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS.....	139
4.3.2.1.1 - PADRONIZAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO A GENTAMICINA	142
4.3.2.1.2 – PADRONIZAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO A CANAMICINA COMO PADRÃO SECUNDÁRIO	148
4.3.2.1.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA A GENTAMICINA	151

4.3.2.1.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A ANÁLISE DE GENTAMICINA	154
4.3.3 – QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO NEOMICINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	155
4.3.3.1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	156
4.3.3.2 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A ANÁLISE DE NEOMICINA.....	165
4.4 – DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR CLAE-MULTIDIMENSIONAL PARA ANÁLISE DE CEFACETRIL EM LEITE BOVINO UTILIZANDO O MS COMO DETECTOR	167
4.5 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ENANTIOSSELETIVO POR INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ALBENDAZOL POR LC-MS-MS	191
4.5.1 – DESENVOLVIMENTO	191
4.5.2 – VALIDAÇÃO	207
5 - CONCLUSÕES .....	216
5.1 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE COLUNAS RAM-BSA	216
5.2 – AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE PAREAMENTO IÔNICO E DETECÇÃO POR ELSD	217
5.3 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR CLAE-MULTIDIMENSIONAL PARA ANÁLISE DE ANTIBIÓTICOS CEFALOSPORÍNICOS EM LEITE BOVINO UTILIZANDO MS COMO DETECTOR	218
5.4 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO ENANTIOSSELETIVO POR INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ALBENDAZOL POR LC-MS-MS EM LEITE BOVINO	219
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	219

# INTRODUÇÃO

---

*"Todo mundo tem dentro de si um fragmento de boas notícias.  
A boa notícia é que você não sabe quão extraordinário você pode ser!  
O quanto você pode amar! O que você pode executar!  
E qual é o seu potencial!"*

ANNE FRANK

## **1 – INTRODUÇÃO**

### **1.1 – MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS E A PECUÁRIA MODERNA**

Na prática da 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 intuito de prevenir o aparecimento de doenças. Além disso, agentes promotores do crescimento como os hormônios e determinados medicamentos veterinários são aplicados para estimular o crescimento dos animais, o que é considerado uma prática excessiva no uso desses medicamentos.<sup>1</sup>

É evidente que há benefícios importantes para os pecuaristas quando do uso ilegal dessas substâncias; geralmente, o uso desses medicamentos melhora a absorção e a conversão dos alimentos levando a um ganho em proteínas e sais minerais estimulando o crescimento dos animais. No entanto, essas substâncias podem permanecer nos alimentos derivados dos animais tratados, levando a resíduos destes nos alimentos.

A presença destes medicamentos veterinários como resíduos exerce alguns efeitos diminuindo a qualidade dos alimentos. Por exemplo, o uso de agentes promotores de crescimento leva a um aumento na velocidade de lipólise gerando uma decomposição química de triacilglicerois, e conseqüente diminuição de gordura com efetiva perda no sabor do alimento. Uma notável retenção de água também é verificada com o uso dessas substâncias, onde o resultado é uma carne dura e pouco succulenta.<sup>2</sup>

Além de prejuízos significantes para indústria de processamentos entre outras, devido à baixa qualidade dos produtos, a presença desses resíduos em alimentos podem causar sérios problemas à saúde humana.

Muitos desses compostos podem exercer efeitos genotóxicos, imunotóxicos, carcinogênico ou endócrino<sup>2</sup>. Deste modo, há um interesse evidente em organizações oficiais e indústrias alimentícias em controlar, com certo grau de segurança, a presença dessas substâncias nos alimentos de origem animal, uma vez que o uso indiscriminado desses medicamentos tem causado sérios problemas relacionados à saúde pública.

O FDA (Food and Drug Administration), nos Estados Unidos, e as Diretrizes da União Européia exigem severo controle no uso destes medicamentos envolvendo a produção de alimentos.<sup>3,4</sup> De acordo com essas diretrizes, as substâncias são classificadas em dois grupos, um grupo A que compreende substâncias proibidas, e um grupo B que compreende outros medicamentos veterinários autorizados, mas que possuem limites estabelecidos (**Tabela 1.1**).

Para os antibióticos da classe das  $\beta$ -lactamas, por exemplo, a tolerância destes resíduos permitidos em leite pelo FDA é de 5 ng/mL para a penicilina G, 10 ng/mL para a amoxicilina, ampicilina e cloxacilina e 20 ng/mL para a cefapirina.<sup>3</sup>

No que se refere aos anti-helmínticos, para o tiabendazol (TBZ), o benzinidazol mais antigo utilizado, a tolerância permitida em leite de acordo com as normas da Comunidade Européia (EC) é de 100  $\mu$ g/Kg para a soma TBZ e o metabólito 5-hidroxi-tiabendazol (5-OH-TBZ).<sup>1</sup>

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) estabelece que o limite máximo de resíduos (LMR's) é competência do Ministério da Saúde e da Agricultura e no caso de não estarem estabelecidos por este ministério, utiliza-se os internacionalizados no Mercosul, os recomendados pela Codex Alimentarius, os constantes nas Diretrizes da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA e Japão.<sup>4</sup>

Os antibióticos, na sua maioria, atuam como promotores do crescimento e têm sido utilizados de forma abusiva levando principalmente ao desenvolvimento de resistência microbiana no homem. Os anti-helmínticos, embora sejam usados para o seu propósito, no tratamento de infecções parasitárias, também tem causado sérios problemas, devido à falta de respeito por parte dos pecuaristas com relação aos prazos de eliminação e a posologia aplicada ao animal.

**Tabela 1.1:** Classe de medicamentos veterinários/contaminantes autorizados para tratamentos terapêuticos e substâncias não autorizadas, com efeito anabolizante, rigorosamente controladas pela União Européia. <sup>1,2</sup>

<b>Grupo A: classe de substâncias proibidas, com efeito anabólico</b>	<b>Grupo B: classe de substâncias autorizadas, mas com limites residuais estabelecidos</b>
<b>1-</b> Estilbenos	<b>1-</b> Bactericidas
<b>2-</b> Agentes antitiróideos	<b>2-</b> Anti-helmínticos
<b>3-</b> Esteróides	<b>3-</b> Carbamatos e piretróides
<b>4-</b> Lactonas do ácido resorcílico incluindo zeranol	<b>4-</b> Sedativos
<b>5-</b> Beta-antagonistas	<b>5-</b> Anti-inflamatórios não esteróides
<b>6-</b> Nitrofuranos	<b>6-</b> Organoclorados e organofosforados
	<b>7-</b> Micotoxinas

### 1.1.1 – ANTIBIÓTICOS

O termo antibiótico é utilizado para uma grande diversidade de compostos, naturais ou semi-sintéticos, que possuem a capacidade de inibir os processos biológicos vitais de microorganismos. É na síntese da parede celular, um dos estágios mais importantes para a sobrevivência das bactérias, que os antibióticos atuam. <sup>6</sup>

O conceito e prática dos antibióticos tiveram sua origem na antiga medicina chinesa. Em 1877, o potencial clínico dos produtos com microorganismos como agentes terapêuticos foi reconhecido por Pasteur e Joubert, mas somente em 1930-1940 foi descoberta a sulfanilamida por Domagk e a penicilina por Fleming tornando possível o aprimoramento da quimioterapia de infecções.<sup>6</sup>

O uso dos antibióticos na pecuária começou em 1950 com o uso da oxitetraciclina e clortetraciclina como complemento alimentar. Hoje em dia estas e outras classes de antibióticos são comumente usadas na prevenção e tratamento de doenças, ou como agentes que promovem o crescimento desses animais<sup>7</sup>. Os antibióticos podem ser administrados oralmente, por adição nos alimentos, ou diretamente por via intramamária ou intramuscular.

Dentre os antibióticos mais utilizados na medicina veterinária, pode-se destacar os aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactamas, tetraciclinas, macrolídeos, peptídeos, quinolonas, cloranfenicol, o verde de malaquita e os quimioterápicos sulfonamidas (e trimetoprima).

O uso de antibióticos não autorizados, a falta de respeito aos prazos de eliminação dos mesmos antes da comercialização de alimentos provenientes de animais medicados, o abuso na administração e a não utilização dos medicamentos de acordo com as recomendações prescritas, podem resultar em resíduos dos mesmos em alimentos de origem animal.

A grande problemática com respeito à presença dos resíduos de antibióticos em produtos destinados ao consumo está relacionada à saúde pública, onde indivíduos sensíveis podem sofrer reações alérgicas, assim como o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos comuns, e também à prejuízos de ordem econômica, onde esses resíduos podem interferir na produção e desenvolvimento de outros produtos, como por exemplo, em culturas de lactobacilos utilizados na produção de queijo e produtos originários do leite

indicando que o produto consumido é originado de um animal com sérios problemas infecciosos.<sup>8</sup>

O problema da presença de antibióticos no leite tende a piorar devido ao desenvolvimento de um hormônio denominado somatomamotrofina, produzido por engenharia genética através de técnicas de DNA recombinante, que estimula as mamas das vacas a produzir mais leite. Por outro lado esse hormônio também aumenta a incidência de mastite o que, por sua vez, implica em maior uso de antibióticos para sanar o problema.<sup>8</sup>

A mastite bovina, caracterizada por um processo inflamatório no úbere das vacas por bactérias e/ou fungos, é hoje um dos problemas mais sérios encontrados na pecuária leiteira, reduzindo a produção e chegando em muitos casos à perda efetiva da mesma. Além disso, a doença leva a uma modificação na composição físico-química do leite, diminuindo os níveis de gordura e proteína, além de ocasionar alterações de consistência e coloração (**Tabela 1. 2**).

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo, e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na produção de leite. Em países como a Dinamarca, é a causa de 30 a 40% das intervenções veterinárias; nos EUA, estima-se que haja um prejuízo de cerca de US\$ 1,8 bilhões/ano em função da ocorrência de mastite. Já no Brasil, pode-se deduzir que, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, possa ocorrer perda de produção entre 12 e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros.<sup>10,11</sup>

Além dos prejuízos na produção primária, a mastite também é um problema para as indústrias de laticínios. A utilização de leite de baixa qualidade tem implicações tecnológicas relevantes como, por exemplo, o baixo rendimento na fabricação dos derivados, a diminuição do prazo de validade dos produtos e também alterações nas características originais do leite e dos derivados.<sup>9,10</sup>



As principais classes de antibióticos usadas na pecuária para o tratamento da mastite pertencem às  $\beta$ -lactamas, tetraciclinas, aminoglicosídeos, ionofóreos e macrolídeos.<sup>7,11</sup>

**Tabela 1.2:** Alterações na composição do leite causadas pela mastite.<sup>11</sup>

<b>Componente</b>	<b>Leite Normal</b>	<b>Leite Mastítico</b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Gordura	3,5	3,2
Lactose	4,9	4,4
Proteína total	3,61	3,56
Caseína total	2,8	2,3
Proteína do soro	0,8	1,3
Albumina sérica	0,02	0,07
Lactoferrina	0,02	0,1
Imunoglobulinas	0,1	0,6
Sódio	0,057	0,105
Cloreto	0,091	0,147
Potássio	0,173	0,157
Cálcio	0,12	0,04

### **1.1.1.1 – AMINOGLICOSÍDEOS**

#### **1.1.1.1.1 – HISTÓRIA, ORIGEM E ATIVIDADE BACTERICIDA**

Nos anos de 1930 e 1940, a descoberta da penicilina estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de outros agentes antimicrobianos. Em 1943, Schatz e colaboradores descobriram e isolaram um grupo particular de fungo,

*Streptomyces griseus*, que produzia estreptomicina, um potente agente antimicrobiano ativo contra vários microorganismos aeróbicos gram-positivos e gram-negativos.

A partir da estreptomicina, o primeiro antibiótico aminoglicosídeos isolado, vários outros estudos levaram ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos como, por exemplo, a neomicina a partir da *Streptomyces fradiae*, canamicina a partir da *Streptomyces Kanamyceticus* e da gentamicina a partir do *Micronospora purpurea*.<sup>6,12</sup> A **Tabela 1.3** apresenta os microorganismos responsáveis pela produção de importantes antibióticos aminoglicosídeos, assim como os cientistas responsáveis por tais descobertas.

Os aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos usados freqüentemente no tratamento de doenças em seres humanos e animais, causados por bactérias aeróbicas gram-positivas e gram-negativas, não sendo ativos contra bactérias anaeróbicas devido ao bloqueio de sua ação sobre essas condições.<sup>13</sup>

A atividade antimicrobiana dos aminoglicosídeos é baseada na habilidade dos mesmos em inibir a síntese de proteína dos microorganismos, resultando em uma rápida concentração dependente da ação bactericida; vale ressaltar que os outros agentes antimicrobianos que afetam a síntese de proteína são apenas bacteriostáticos.<sup>6</sup>

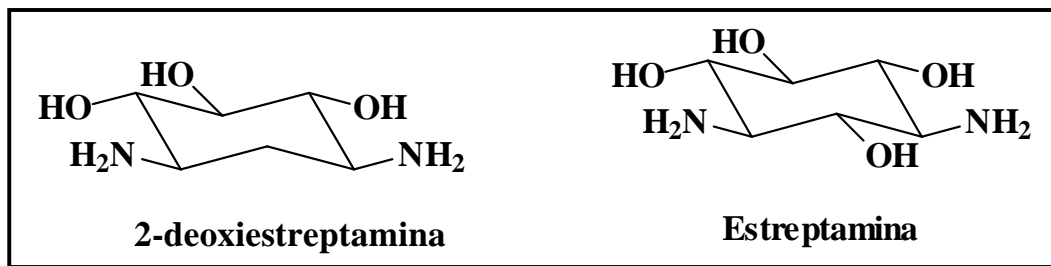
Na medicina veterinária os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções por bactérias, como por exemplo, enterites e mastites, sendo também adicionados à comida para a prevenção de doenças e para promover o crescimento dos animais. Os mais comumente utilizados são a gentamicina, neomicina, dihidroestreptomicina e estreptomicina. Há uma grande preocupação com os resíduos desses antibióticos em alimentos devido a sua toxicidade, uma vez que todos os membros desse grupo são nefro e ototóxicos.<sup>6, 12-</sup>

**Tabela 1.3:** Organismos que produzem aminoglicosídeos específicos <sup>12</sup>

<b>Aminoglicosídeo</b>	<b>Organismo</b>	<b>Descoberto por, ano</b>
Streptomicina	<i>S. griseus</i>	Waksman e Schatz, 1944
Neomicina	<i>S. fradiae</i> e <i>S. albogriseolus</i>	Umezawa e Waksman, 1949
Canamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Umezawa, 1957
Dihidroestreptomicina	<i>S. griseus</i> e <i>S. humidus</i>	Takeda Chemicals, 1957
Paromomicina	<i>S. rimosus</i>	Parke Davis, 1959
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i> e <i>M. echinospora</i>	Schering Plough, 1963
Trobamicina	<i>S. tenebrarius</i>	Eli Lilly, 1967
Sisomicina	<i>M. inoyoensis</i>	Schering Plough, 1970

#### 1.1.1.1.2 – CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E CARACTERÍSTICA QUÍMICA

Os antibióticos aminoglicosídeos são caracterizados pela presença de um anel aminociclitol (um hidroxiciclohexano amino substituído) ligado a dois ou mais aminoaçúcares por ligações glicosídicas. Estes, de acordo com a substituição do anel aminociclitol, são divididos em dois grupos: estreptamina e 2-deoxiestreptamina (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1:** Estrutura química característica dos antibióticos aminoglicosídeos.

O grupo 2-deoxiestreptamina é o maior e é dividido em dois subgrupos de acordo com o número e posição dos substituintes no anel aminociclitol; destes, os grupos mais conhecidos são os que possuem os substituintes em posições adjacentes (posições 4 e 5) envolvendo os antibióticos neomicina e paronomicina, e os que não possuem os substituintes em posições adjacentes (posições 4 e 6) envolvendo os antibióticos gentamicina e canamicina. O grupo estreptamina envolve os antibióticos estreptomicina e dihidroestreptomicina.<sup>12</sup> A **Figura 1.2** apresenta as estruturas químicas dos antibióticos aminoglicosídeos citados.

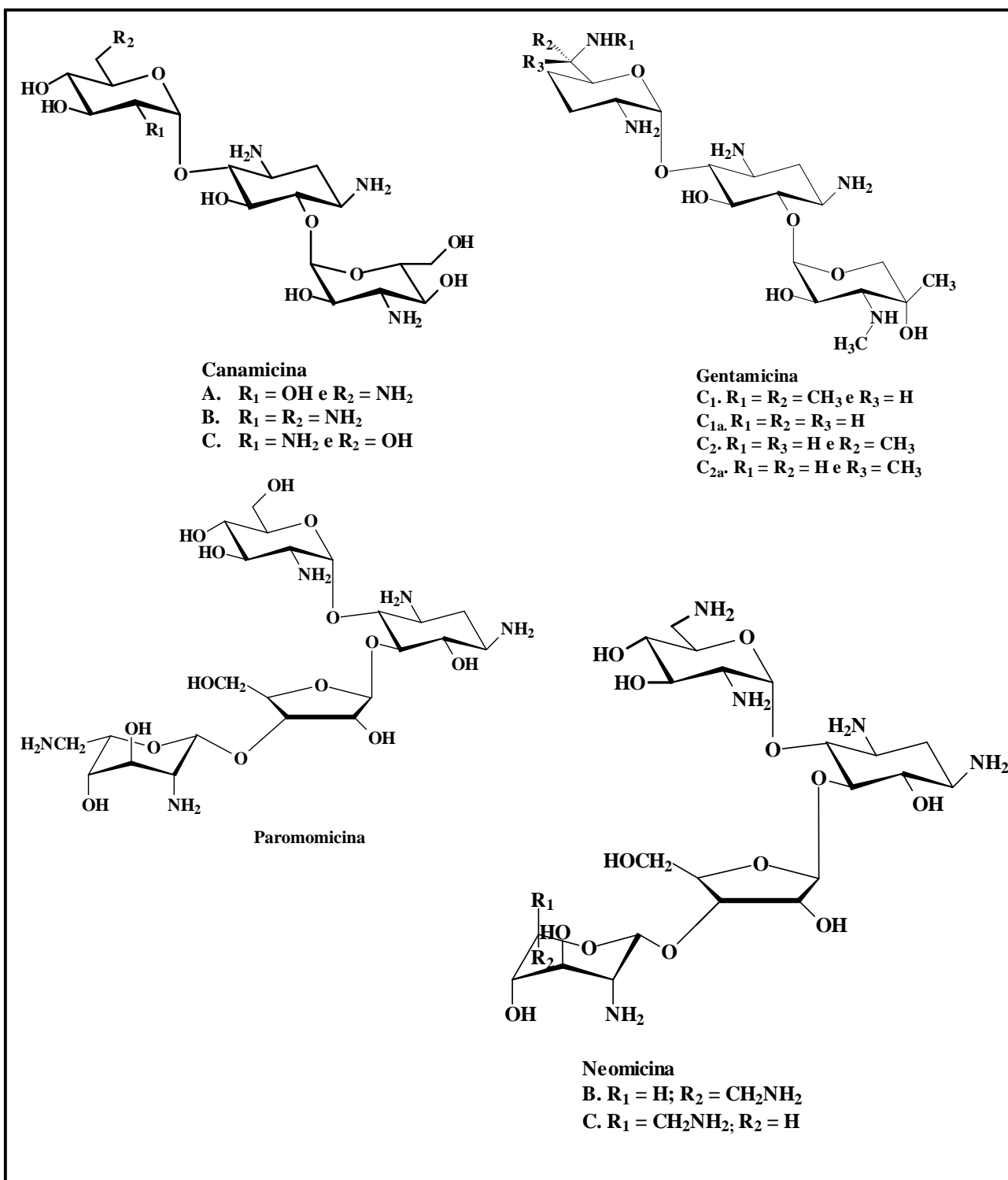
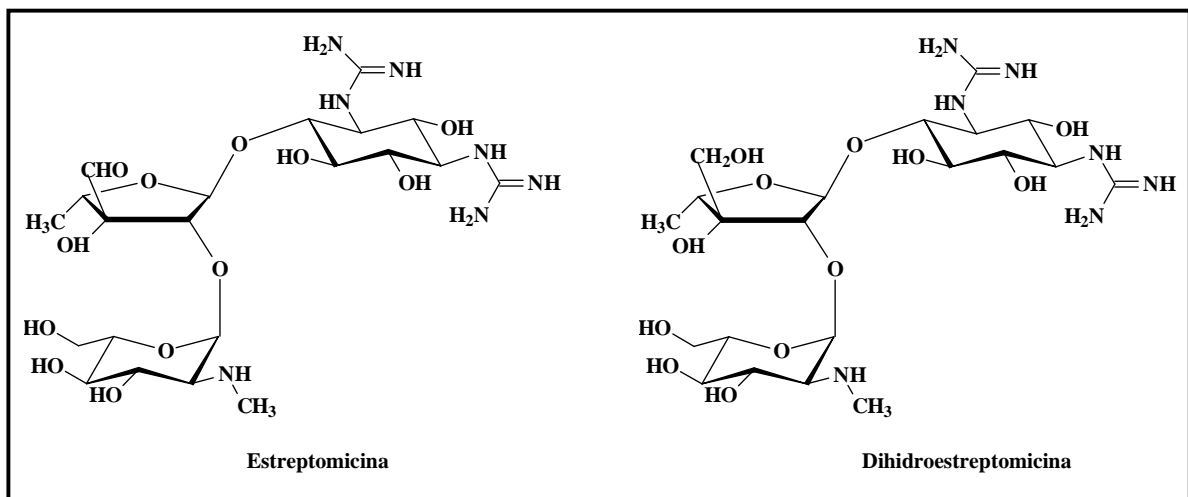


Figura 1.2: Estrutura química dos antibióticos aminoglicosídeos (Continua).



**Figura 1.2:** Estrutura química dos antibióticos aminoglicosídeos (Conclusão).

Os aminoglicosídeos exibem todas as propriedades físico-químicas que dificultam o desenvolvimento de métodos confirmatórios apropriados; são compostos básicos, hidrofílicos e polares, tornando difícil a extração a partir de matrizes complexas; são termicamente lábeis tornando análises por GC praticamente impossíveis e não possuem grupos cromóforos dificultando a análise por LC-UV. São solúveis em água, parcialmente solúveis em metanol e praticamente insolúveis em solventes orgânicos hidrofóbicos.<sup>11, 12</sup>

Em soluções aquosas, os aminoglicosídeos encontram-se protonados devido à presença de grupos amino, os quais variam de quatro na canamicina a seis na neomicina e cujos valores de pKa encontram entre 7 e 8,8. As características físicas e químicas dos aminoglicosídeos com atividades terapêuticas são apresentadas na **Tabela 1.4**.<sup>12</sup>

Dentro do grupo dos aminoglicosídeos, foram selecionados para estudo os seguintes antibióticos: Estreptomicina, Neomicina e Gentamicina, sendo este último uma mistura de antibióticos aminoglicosídeos semelhantes, cujos componentes principais são gentamicina C<sub>1</sub>, gentamicina C<sub>1a</sub>, gentamicina C<sub>2</sub> e gentamicina C<sub>2a</sub>.<sup>16</sup> Além das dificuldades discutidas anteriormente, a pequena

diferença dos substituintes nesses componentes principais contribui para tornar sua análise ainda mais complicada.

A Estreptomicina, Neomicina e Gentamicina são princípios ativos dos medicamentos de uso veterinário: Leocillin®, Newmast® e Mastifin respectivamente. Estes medicamentos são amplamente utilizados na medicina veterinária principalmente no tratamento da mastite bovina.

### **1.1.1.1.3 – MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS**

Historicamente, os ensaios microbiológicos, radioenzimáticos (REA) e radioimunológicos (RIA) têm sido utilizados na determinação de resíduos de antibióticos aminoglicosídeos no leite, embora seja reconhecida a falta de performance quantitativa ou qualitativa desses métodos.

O ensaio microbiológico baseia-se na difusão em agar da substância e da concentração dependente do crescimento da inibição (zona de inibição) do organismo analisado, o qual é inoculado no agar. Este ensaio requer de 12 a 48 horas de incubação, após a qual a inibição da bactéria em crescimento é medida.

Vários fatores influenciam na precisão e exatidão do método, entre eles a temperatura de incubação, pH do agar e concentração de íons, profundidade do agar no prato, teste de tensão, tempo de incubação e a presença de outros antibióticos na amostra podem afetar o ensaio, além da necessidade do uso de diferentes pHs no agar para diferentes aminoglicosídeos.

Apesar de os métodos microbiológicos serem versáteis, simples e relativamente baratos, eles são sujeitos a interferências causadas por inibidores não específicos ou outros fármacos antimicrobianos. Além disso, a repetibilidade e

reprodutibilidade dos resultados são geralmente baixas, de acordo com a matriz avaliada.<sup>12,13,17</sup>

**Tabela 1.4:** Características físicas e químicas dos antibióticos aminoglicosídeos<sup>12</sup>

<b>Aminoglicosídeo</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Massa Molar (g/mol)</b>	<b>Ponto de Ebulição (°C)</b>	<b>Rotação Ótica [<math>\alpha</math>]<sub>D</sub></b>
Amicacina	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	585,6	203-204	+99°
Dihidroestreptomicina	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	583,6	-	Levógiro
Dibecacina	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	451,5	-	+132°
Gentamicina C <sub>1</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	477,6	94-100	+158°
Gentamicina C <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	463,6	107-124	+160°
Gentamicina C <sub>1a</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	449,5	-	+165,8°
Canamicina A	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub>	485,2	-	+146°
Canamicina B	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub>	483,6	178-182	+114°
Canamicina C	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub>	484,6	-	+126°
Neomicina	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	614,6	-	+80°
Netilmicina	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	475,6	-	+164°
Sisomicina	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	447,5	198-201	+189°
Estreptomicina	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	581,6	-	Levógiro
Tobramicina	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	467,5	-	+128°

O ensaio radioimunológico é um aperfeiçoamento do microbiológico, sendo mais sensível e específico, no entanto, a presença de outros antibióticos aminoglicosídeos pode causar interferências. Este tipo de análise requer complicados parâmetros de otimização, assim como especialização do analista, pois a seleção e preparação dos anticorpos específicos disponíveis são difíceis; além



disso, a manipulação de materiais radioativos, o lixo radioativo produzido e o alto custo são fatores que tornam o método pouco atrativo.<sup>12,13,17</sup>

O método radioenzimático oferece vantagens similares as do radioimunológico, entretanto a instabilidade das enzimas e a presença de outros antibióticos na amostra pode causar resultados falsos, ocasionando a destruição desnecessária de lotes de leite.<sup>12,13,17</sup>

Poucos métodos por cromatografia gasosa têm sido desenvolvidos para a análise dos aminoglicosídeos, uma vez que esses compostos não são voláteis o suficiente ou são termicamente instáveis, sendo necessárias etapas de derivação para posterior análise.<sup>11,13</sup>

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido a sua sensibilidade e seletividade, tem sido a técnica analítica mais empregada na análise de antibióticos aminoglicosídeos; no entanto, vários métodos desenvolvidos apresentam problemas de robustez e reprodutibilidade. Além disso, a baixa solubilidade em solventes orgânicos dificulta a extração e concentração dos analitos a partir da matriz biológica, envolvendo etapas de pré-tratamento laboriosas.<sup>13</sup>

A maioria dos métodos de pré-tratamento e extração dos antibióticos aminoglicosídeos a partir de matrizes complexas, faz uso de cromatografia de troca iônica em pH alto ou baixo, ou pareamento iônico, em solução aquosa ou metanólica. De um modo geral, a extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de troca catiônica é a técnica mais empregada.

Para as análises envolvendo leite, por exemplo, é realizado uma extração líquido-líquido para a retirada de gordura, em seguida as proteínas são precipitadas com ácidos, como por exemplo, o tricloroacético (TCA) para posterior extração em fase sólida utilizando cartuchos de troca iônica, geralmente WCX-SPE (weak cation exchange-solid phase extraction).<sup>18-24</sup>

Do mesmo modo, devido ao caráter polar destes compostos, as análises por cromatografia no modo reverso de eluição são dificultadas. Os métodos utilizados para minimizar estes problemas são:

a) uso de cromatografia de troca iônica (colunas SCX (strong cation exchange) ou WCX (weak cation exchange));

b) cromatografia de pareamento iônico utilizando colunas C<sub>18</sub> na presença de alquilsulfonatos como agentes de pareamento iônico, ou em combinação com detectores como o espalhamento de luz (ELSD) e o espectrômetro de massas (MS) utilizando como fase móvel agentes de pareamento voláteis como ácido pentafluorpropiónico (PFPA) e ácido heptafluorbutírico (HFBA); ou ainda

c) métodos de derivação para a obtenção de compostos menos polares podendo ser separados e analisados por cromatografia no modo reverso.<sup>19,20,25,26</sup>

A derivação desses compostos também auxilia no desenvolvimento de métodos com a utilização de detectores como o ultravioleta e/ou fluorescência, uma vez que os aminoglicosídeos não possuem grupos cromóforos. Deste modo, os métodos desenvolvidos utilizando esses detectores obrigatoriamente fazem uso de pré/pós-coluna de derivação. Os problemas relacionados a esses métodos são tempos de análise extensos, baixa sensibilidade, e às vezes, falta de reprodutibilidade pode ser verificada devido à ocorrência de reações incompletas.

Detectores como o espectrômetro de massas e o espalhamento de luz têm se destacado na análise dessa classe de compostos. Uma das grandes vantagens da utilização do espectrômetro de massas como detector nas análises cromatográficas de resíduos de antibióticos em matrizes biológicas é, além da alta sensibilidade e da possibilidade de identificação, a não necessidade de derivação da amostra.

A maioria dos métodos descritos utilizando LC-MS para este tipo de análise faz uso das interfaces ESI (*electrospray*) e APCI (*ionização química a pressão atmosférica*), por serem técnicas de ionização mais brandas.<sup>11, 12, 15, 27, 28</sup>

O detector de espalhamento de luz (ELSD) é um detector bastante utilizado para quantificação de ácidos graxos e análise de pureza; tem como princípio a nebulização da fase móvel com um gás inerte e evaporação do solvente para produzir pequenas partículas que serão detectadas em uma cela de espalhamento de luz. A intensidade da luz espalhada depende do tamanho das partículas formadas durante o processo de nebulização.<sup>29, 30</sup> É um detector com menor sensibilidade, mais simples e barato quando comparado ao espectrômetro de massas, e tem sido bastante utilizado na análise de formulações de antibióticos aminoglicosídeos.<sup>31-38</sup>

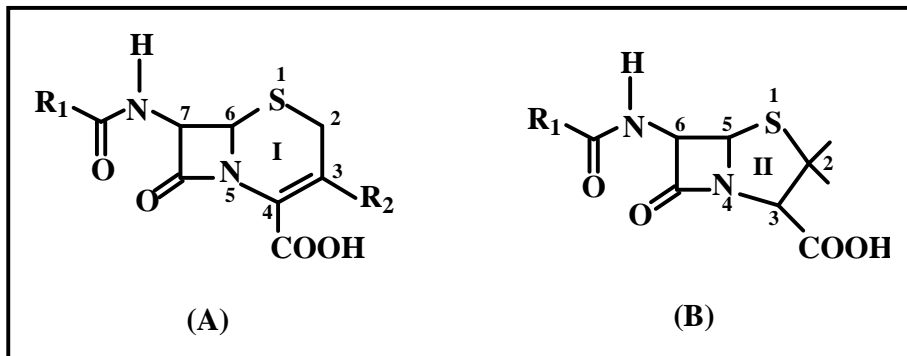
### **1.1.1.2 – ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS**

Assim como os aminoglicosídeos, a classe de antibióticos pertencentes às  $\beta$ -lactamas, que incluem as penicilinas e cefalosporinas, está dentre as mais amplamente utilizadas na medicina veterinária, em especial no tratamento da mastite bovina.<sup>1</sup>

#### **1.1.1.2.1 – CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E CARACTERÍSTICA QUÍMICA**

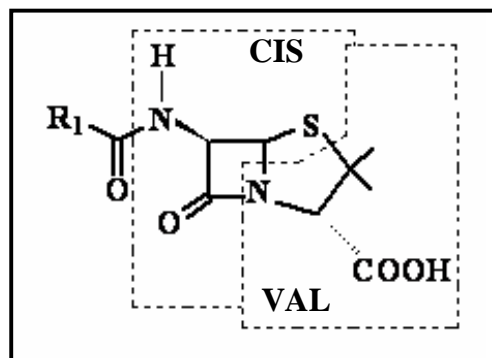
Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos consistem basicamente de duas classes de compostos termolábeis que compreendem as penicilinas e cefalosporinas. Ambas as classes contém uma cadeia lateral volumosa ligada ao ácido nucléico 7-aminocefalosporínico (anel diidrotiazina (I) de 6 membros nas cefalosporinas (A)),

e ao ácido 6-aminopenicilínico (anel tiazolidina (II) de 5 membros nas penicilinas (B)) respectivamente, como apresentado na **Figura 1.3**.<sup>1, 39,40</sup>



**Figura 1.3** – Núcleo das cefalosporinas (A) e das penicilinas (B).

Um estudo mais detalhado, realizado com os antibióticos cefalosporínicos revela que esses podem ser derivados a partir do mesmo precursor das penicilinas, a cisteína e a valina (**Figura 1.4**).<sup>41</sup>



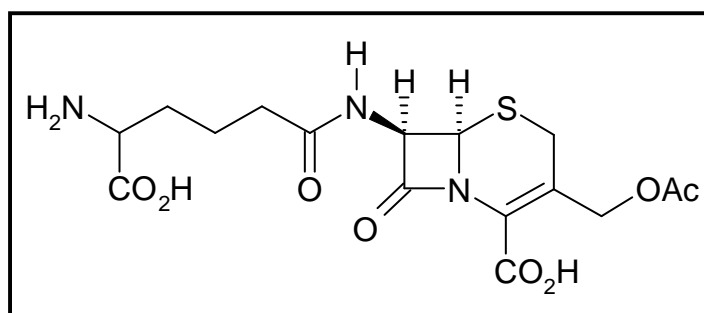
**Figura 1.4** – Precursores das penicilinas e cefalosporinas.<sup>41</sup>

Os antibióticos cefalosporínicos são divididos em quatro gerações de acordo com a extensão da sua atividade antibacteriana e assumem hoje um papel importante na medicina veterinária devido ao amplo espectro antibacteriano que possuem contra bactérias Gram-positivas e negativas<sup>42</sup>. Apresentam vantagens clínicas de serem antibióticos de baixo risco alérgico, não tóxicos, o que garantem

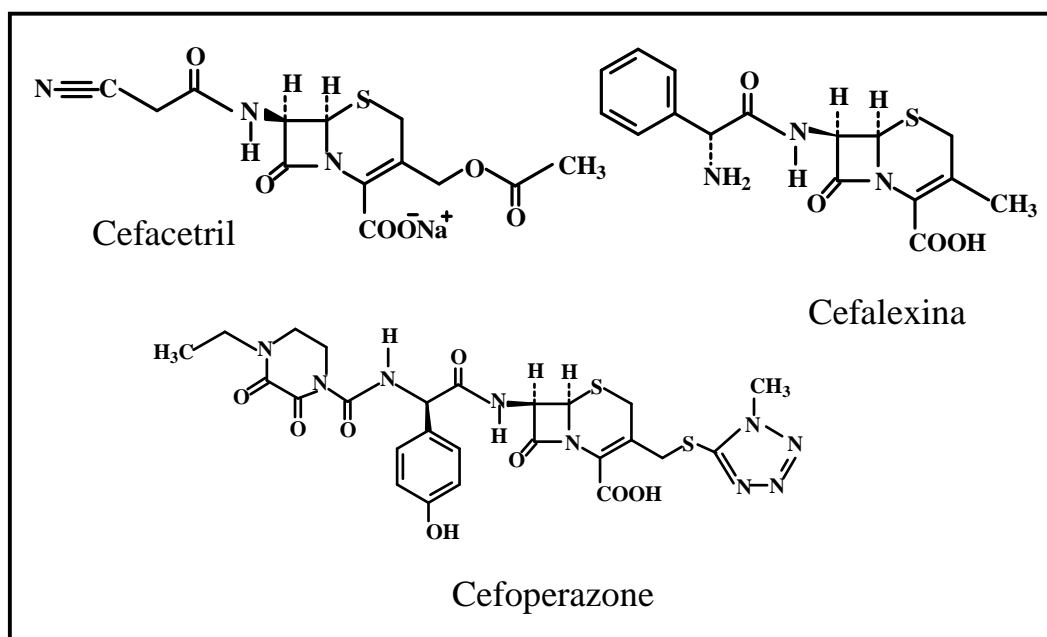
uma ampla utilização desta classe de fármacos no tratamento da mastite bovina.<sup>39, 40, 42, 43</sup>

As cefalosporinas naturais exibem pouca atividade antibacteriana; no entanto, modificações estruturais da cefalosporina C (**Figura 1.5**), a única encontrada na natureza, pela adição de diferentes cadeias laterais gerou toda a classe de antibióticos das cefalosporinas (**Figura 1.6**).

As modificações realizadas na posição 7 do anel  $\beta$ -lactâmico (acilamida) estão associadas a uma alteração na atividade antibacteriana, enquanto que as substituições na posição 3 do anel diidrotiazínico (3-acetoximetila) encontram-se associadas a mudanças no metabolismo e nas propriedades farmacocinéticas destes fármacos.<sup>42</sup> Essas modificações no entanto, são realizadas de modo a preservar os sítios ativos da molécula, onde o anel  $\beta$ -lactâmico, o sistema bicíclico, a estereoquímica dos grupos ligados aos anéis e a presença de um ácido carboxílico livre na posição 4 são essenciais.<sup>41, 43, 44</sup>

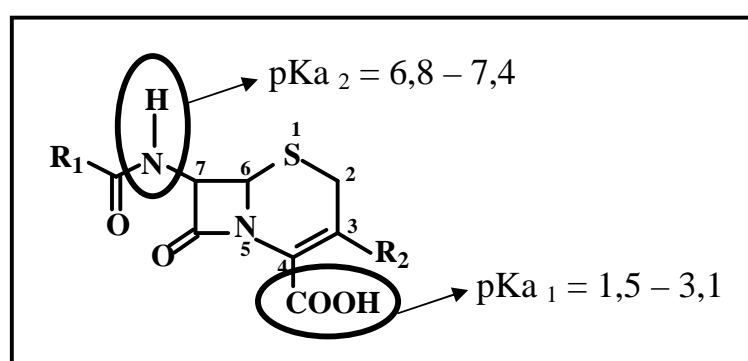


**Figura 1.5** – Estrutura química da cefalosporina C.<sup>41</sup>



**Figura 1.6** – Estrutura química de alguns antibióticos cefalosporínicos.

Em geral, os antibióticos cefalosporínicos são hidrofílicos e possuem no mínimo dois sítios propícios para ionização, sendo um de caráter ácido (ácido carboxílico;  $pK_{a1} = 1,5 - 3,1$ ) e outro de caráter básico (amina;  $pK_{a2} = 6,8 - 7,4$ ) (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7** – Sítios de ionização do núcleo cefano.

Essas características conferem a estes compostos propriedades químicas que dificultam sua extração e análise a partir de matrizes complexas, uma

vez que pequenas variações no meio alteram completamente o comportamento desses compostos.

### **1.1.1.2.2 – APRESENTAÇÃO DOS MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS CEFALOSPORÍNICOS**

Assim como para os aminoglicosídeos, ensaios imunológicos e microbiológicos têm sido amplamente utilizados para a determinação de resíduos de antibióticos cefalosporínicos em leite. Do mesmo modo, é constante a busca por métodos de análise simples, seletivos, sensíveis e seguros e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se destacado, principalmente quando acoplada a técnicas de detecção mais sensíveis como espectrometria de massas.

O uso da CLAE permite, além do desenvolvimento clássico de métodos analíticos, o desenvolvimento de métodos sensíveis, precisos e seletivos, adequados para aplicação em estudos relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos e em testes comprobatórios da ausência de resíduos de antibióticos em alimentos.<sup>6, 45</sup>

Deste modo, foram desenvolvidos vários métodos, tanto para a análise e quantificação de cefalosporinas em fluidos biológicos<sup>6, 11, 27, 45, 46-52</sup> quanto para a análise e quantificação desses antibióticos em formulações farmacêuticas<sup>53-55</sup>.

JOHNSON e colaboradores<sup>47</sup> desenvolveram um método para análise de cefradina em plasma humano utilizando cromatografia no modo reverso de eluição (150 × 4,6 mm d.i.; 5 µm), detecção por UV-VIS e precipitação das proteínas utilizando ácido perclórico 4% (v/v).

NISHINO e colaboradores<sup>48</sup> apresentaram um método de análise de cefmatilena e sete metabólitos em plasma e urina humana e animal; neste trabalho os autores utilizaram duas pré-colunas de troca iônica, sendo a primeira de troca

aniônica e a segunda de troca catiônica seguida da coluna analítica C<sub>18</sub>. O pré-tratamento das amostras envolveu um sistema de ultrafiltração, precipitação e diluição das amostras antes da injeção no sistema cromatográfico. Da mesma forma, MOATS<sup>50</sup> desenvolveu um método multiresíduo em leite bovino e tecidos utilizando como pré-tratamento da amostra precipitação das proteínas seguida de diluição para posterior análise utilizando o modo reverso de eluição com detecção por UV.

Em uma abordagem geral, cromatografia no modo reverso (C<sub>18</sub> e C<sub>8</sub>); fases móveis constituídas por solução tampão com diferentes valores de pH; cromatografia de pareamento iônico e troca iônica e o uso de detecção no ultravioleta são encontrados na maioria desses trabalhos.

Na etapa de pré-tratamento da matriz biológica, os métodos utilizados envolvem a precipitação das proteínas, seguida ou não por uma extração líquido-líquido ou então a extração em fase sólida. A ultrafiltração com membranas também tem sido utilizada.

Em nosso grupo de pesquisa, a injeção direta de amostras tem sido aplicada com sucesso na análise desses compostos em leite bovino, oferecendo várias vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como, economia de tempo, menor manuseio das amostras biológicas e volume reduzido de lixo químico gerado.<sup>56, 57</sup>

### **1.1.2 - ANTI-HELMÍNTICOS**

Assim como os antibióticos, os anti-helmínticos têm sido amplamente utilizados na medicina veterinária na prevenção e no tratamento de vermes e nematóides gastrointestinais. Estudos veterinários mostraram que o gado pode desenvolver imunidade a parasitas no primeiro ou segundo período de pastagem;



no entanto, animais adultos podem ainda serem infectados com diferentes vermes. Estas infecções são normalmente sub-clínicas, mas no caso de vacas leiteiras, têm sido associadas com a diminuição da produção de leite. Além disso, estudos demonstraram que o tratamento de animais infectados influencia significativamente na produção de leite.<sup>58</sup>

O termo anti-helmíntico aplica-se a substâncias que atuam localmente para expulsar os vermes do trato gastrintestinal ou sistemicamente, para erradicar espécies e formas de helmintos em desenvolvimento, que invadem órgãos ou tecidos. Podem atuar produzindo paralisia no verme ou lesionando sua cutícula, resultando em digestão parcial ou rejeição do verme por mecanismos imunológicos; podem também atuar no metabolismo do verme, esgotando suas reservas energéticas.<sup>59, 60</sup>

A administração racional de anti-helmínticos tem trazido benefícios à pecuária, tanto para gado de corte quanto para a pecuária leiteira. De acordo com dados do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado do Paraná, o ganho de peso vivo foi superior em 40 kg nas novilhas tratadas com anti-helmíntico, quando comparadas com aquelas não tratadas.<sup>61</sup>

Da mesma forma, foi também verificado o aumento na quantidade produzida de leite, durante 220 dias de estudos, onde vacas tratadas com anti-helmíntico produziram 63 litros de leite a mais que os animais do grupo controle. A produção de proteínas e gorduras no leite foi também superior nos animais tratados, sendo de 2,8 kg em relação à produção do grupo controle (**Tabela 1.5**).<sup>62, 63</sup>

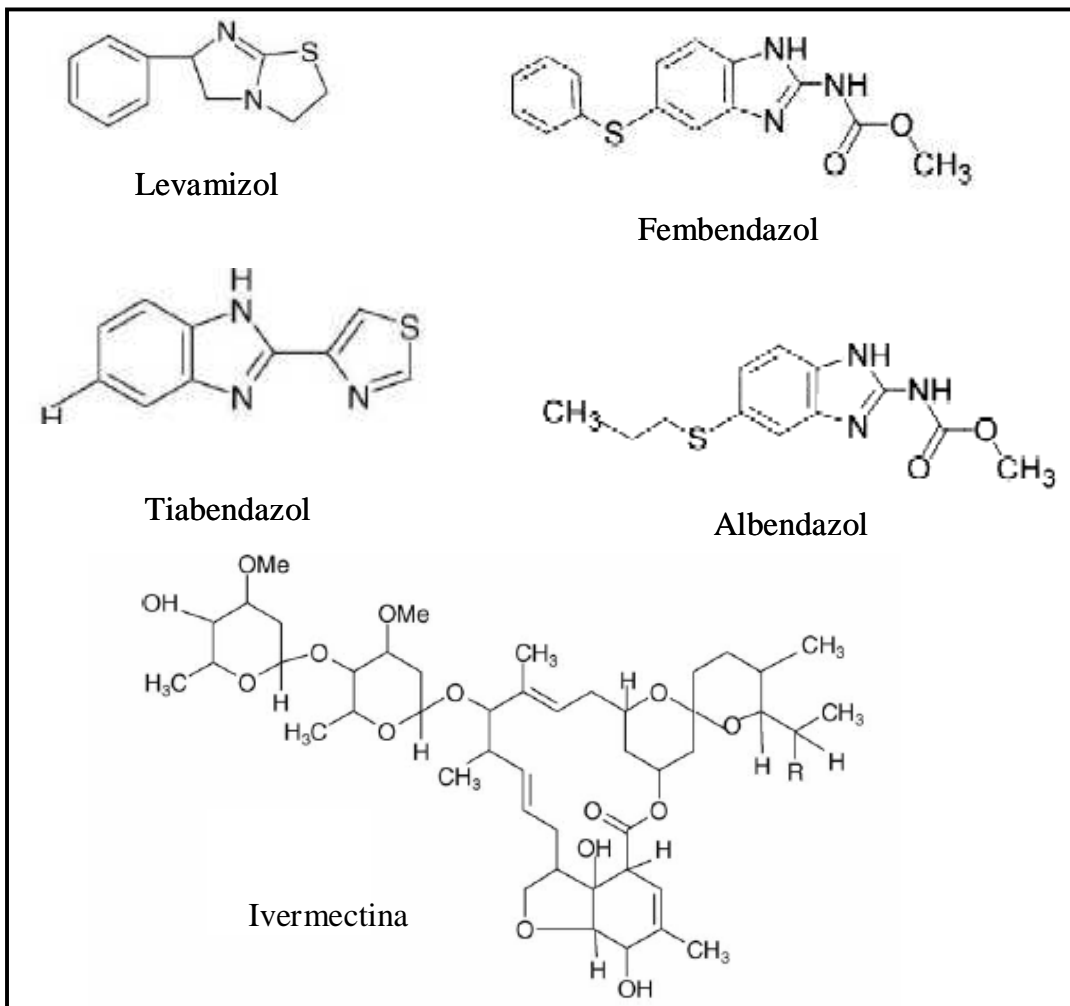
**Tabela 1.5:** Resultado da produção leiteira por animal, de 835 fêmeas tratadas com anti-helmíntico e 835 fêmeas controle tratadas com placebo, durante 220 dias de estudo <sup>62</sup>

<b>Variáveis</b>	<b>Controle sem Tratamento</b>	<b>Tratado com Anti-Helmíntico</b>
<b>Leite (L)</b>	4966	5029
<b>Gordura (kg)</b>	200,4	203,2
<b>Proteína (kg)</b>	164,3	167,1

De acordo com esses dados, a produção leiteira diária é consideravelmente beneficiada com o uso de anti-helmínticos no tratamento de vermes. No entanto, é importante lembrar que o prazo de eliminação desses compostos deve ser respeitado para evitar problemas com relação a resíduos dos mesmos em alimentos.

A principal toxicidade relacionada a estes compostos envolvem efeitos teratogênicos e alguns estudos revelam que os metabólitos apresentam toxicidade superior aos compostos de origem. <sup>64</sup>

As principais classes de anti-helmínticos utilizadas na pecuária pertencem às avermectinas, aos benzimidazóis, imidazotiazóis e salicilanilídeos (**Figura 1.8**).<sup>1</sup> Dentre estes, os benzimidazóis são os mais amplamente utilizados na medicina veterinária, devido ao amplo espectro anti-helmíntico.



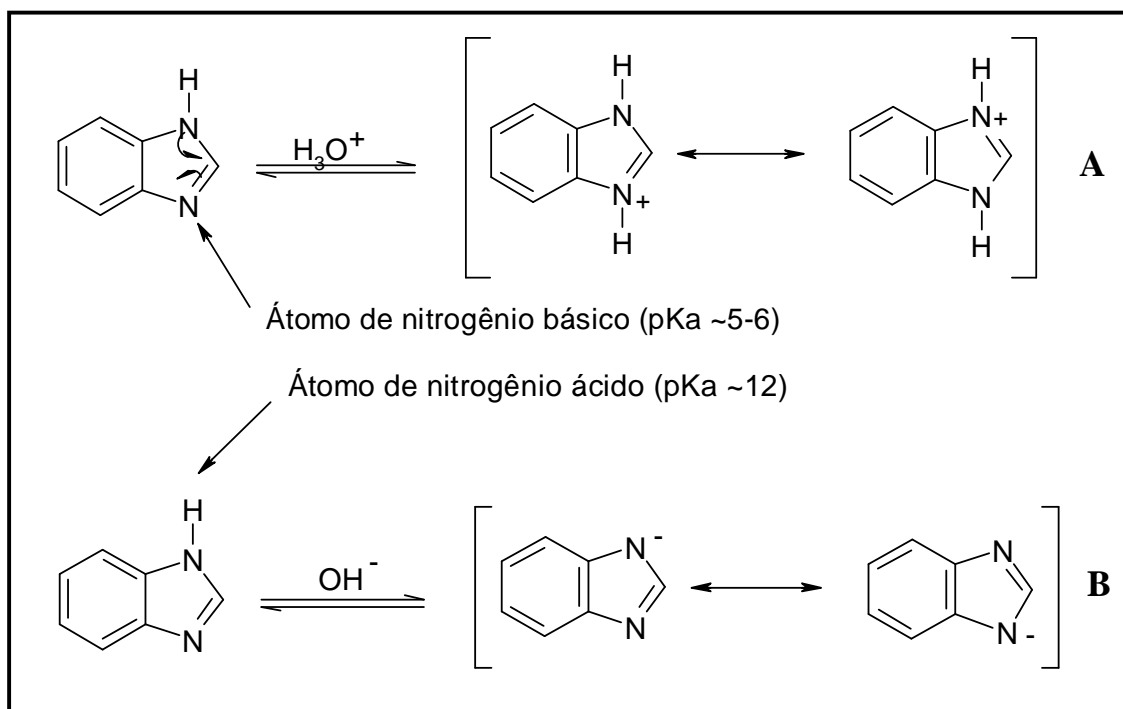
**Figura 1.8:** Principais anti-helmínticos utilizados na medicina veterinária. <sup>1</sup>

### 1.1.2.1 – ANTI-HELMINTICOS BENZIMIDAZÓLICOS

O tiabendazol foi o primeiro anti-helmíntico benzimidazólico a ser comercializado a mais de 40 anos. Desde a sua descoberta, vários anti-helmínticos da classe dos benzimidazóis têm se tornado disponível para o tratamento de uma gama de helmintoses. O amplo espectro de atividade desses medicamentos, o baixo custo, a alta eficácia e a facilidade da sua administração tornaram os benzimidazólicos amplamente utilizados no tratamento, em larga escala, de infecções parasitárias na medicina veterinária. <sup>1, 64</sup>

Diferentes modos de ação têm sido propostos para os medicamentos benzimidazólicos, mas provavelmente a sua principal ação é inibir a polimerização dos microtúbulos, unindo-se à  $\beta$ -tubulina.<sup>63</sup> O albendazol (ABZ), por exemplo, é um pró-fármaco, cujo metabólito é responsável por bloquear a recepção de glicose em parasitas susceptíveis nos estágios de larva e adultos, diminuindo as reservas de glicogênio e conseqüentemente diminuindo a formação de adenosina tri-fosfato (ATP).<sup>64</sup>

A classe dos benzimidazóis possuem basicamente em sua estrutura um anel imidazólico contendo um átomo de nitrogênio ácido e um básico que, sob condições ideais pode estar protonado ( $pK_a \sim 5-6$ ) ou desprotonado ( $pK_a \sim 12$ ), respectivamente (**Figura 1.9**).



**Figura 1.9** – Ionização do núcleo imidazólico sobre condições ácidas (A) e básicas (B).

O albendazol (ABZ) é dentre os benzimidazóis, o anti-helmíntico mais rotineiramente utilizado na medicina veterinária devido ao amplo espectro de

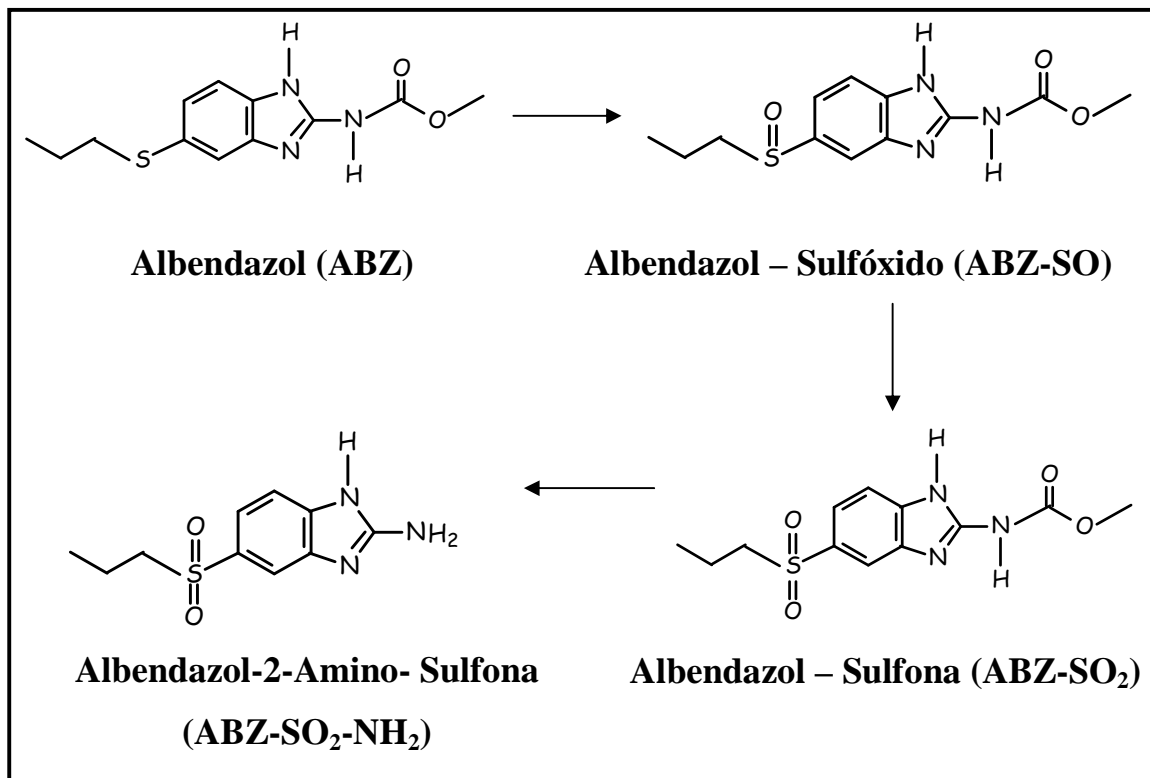
atividade que este possui frente a diferentes classes e estágios de parasitas. É relativamente insolúvel em água e na maior parte dos solventes orgânicos, propriedade esta que influencia sua absorção e comportamento no organismo.<sup>64</sup>

De acordo com DAYAN<sup>65</sup>, a absorção oral de ABZ em camundongos e ratos é aproximadamente de 20-30% e em gado alcança valores de 50%, comparado com aproximadamente 1-5% em humanos. A absorção em humanos é intensificada pela presença de alimentos gordurosos, podendo ser aumentada em até cinco vezes.<sup>59</sup>

O albendazol é um pró-fármaco bastante interessante, uma vez que durante sua metabolização requer ativação no fígado pelo citocromo P450 (CYP450), tanto em animais como em humanos.<sup>65</sup> Essa metabolização, após administração oral, é bastante rápida, não sendo o ABZ detectado em plasma de carneiros, de gado e de humanos.<sup>66</sup>

A farmacocinética do albendazol foi analisada em diferentes espécies animais, onde estudos envolvendo carneiros<sup>66</sup>, bezerros<sup>67</sup> e humanos<sup>68, 69</sup> demonstraram que este é rapidamente e extensivamente metabolizado para a forma albendazol-sulfóxido (ABZ-SO), albendazol-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>) e albendazol-2-amino-sulfona (ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) (**Figura 1.10**).

O albendazol-sulfóxido apresenta um centro assimétrico no átomo de enxofre, apresentando-se na forma dos enantiômeros R-(+)-ABZ-SO e o S-(-)-ABZSO.<sup>69</sup>



**Figura 1.10:** Metabólitos majoritários do albendazol.

O albendazol-sulfóxido, metabólito ativo, é considerado direta ou indiretamente responsável pela eficácia e toxicidade do albendazol, sendo oxidado e convertido em albendazol-sulfona. O grupo carbamato também é rapidamente removido por hidrólise, levando a formação do albendazol-2-amino-sulfona. Este último é o metabólito minoritário e, assim como o albendazol-sulfona, não apresenta atividade farmacológica.<sup>65</sup>

Diferenças no metabolismo deste fármaco têm sido observadas de acordo com o animal estudado.<sup>68, 70</sup> Em estudo realizado por CRISTOFOL e colaboradores<sup>71</sup>, bezerros tratados com ( $\pm$ )-ABZ-SO, apresentaram metabolismos diferentes, onde o S-(-)-ABZ-SO é metabolizado significativamente mais rápido que o seu enantiômero, o R-(+)-ABZ-SO, sendo o (+)-enantiômero detectado em plasma de 2,5 minutos a 32 horas após a administração, enquanto que o (-)-enantiômero foi encontrado de 2,5 minutos a 16 horas.

Tendo em vista que o albendazol é um pró-fármaco e apresenta baixa solubilidade em água (0,61 µg/mL), algumas empresas veterinárias têm comercializado a mistura racêmica do albendazol-sulfóxido, uma vez que este composto é mais solúvel (62 µg/mL) do que o ABZ, devido a presença do átomo de oxigênio.<sup>72</sup>

Uma vez que esses enantiômeros podem apresentar propriedades farmacológicas diferentes entre si quando administrados em bovinos, torna-se importante a existência de métodos analíticos enantiosseletivos para a quantificação simultânea dos metabólitos do albendazol, em fluidos biológicos. Análises desse tipo podem fornecer informações importantes sobre o metabolismo e farmacocinética do fármaco, contribuindo tanto para o controle parasitário em animais quanto para o estudo toxicológico e de resíduos dessas substâncias em alimentos.

### **1.1.2.2 – MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE ALBENDAZOL E SEUS METABÓLITOS**

Ensaio imunológicos e microbiológicos têm sido utilizados para a determinação de albendazol e seus metabólitos. No entanto, os métodos cromatográficos são os que têm prevalecido e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se destacado, principalmente quando acoplada a técnicas mais sensíveis como espectrometria de massas, uma vez que a metabolização desse fármaco é rápida e os níveis de resíduos são baixos.

De uma maneira geral, os métodos fazem uso de cromatografia no modo reverso de eluição, utilizando colunas C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> e fenil e utilizando sistemas de fase móvel baseada na supressão iônica, com o uso de solução tampão com

diferentes valores de pH. Poucos métodos utilizam cromatografia quiral, principalmente na análise de leite bovino.

O uso de detecção no ultravioleta e fluorescência são encontrados na maioria dos trabalhos <sup>64, 66, 68-70, 73-75</sup>; a detecção por espectrometria de massas tem sido mais utilizada para a determinação de resíduos de benzimidazóis em matrizes biológicas com a vantagem de oferecer uma análise quantitativa-confirmatória. <sup>76, 77</sup> A maioria dos métodos reportados faz uso de instrumentos com analisadores do tipo quadrupolo e um número limitado de estudos utilizando o analisador ion-trap. <sup>64, 78</sup>

O pré-tratamento das amostras, de uma maneira geral, envolve etapas de extração em fase sólida ou a extração líquido-líquido utilizando soluções aquosas a um pH alto. Entretanto a polaridade e o pKa podem diferir entre os benzimidazóis e metabólitos não apenas dificultando o desenvolvimento de métodos multi-resíduos, mas também o desenvolvimento de métodos de benzimidazóis específicos e seus metabólitos.

Em métodos desenvolvidos para análise de albendazol em leite <sup>58, 74, 79</sup>, a precipitação de proteínas, seguida da extração líquido-líquido e SPE são as técnicas mais utilizadas; cabe ressaltar que nenhum deles faz uso de extração *on-line* utilizando colunas de acesso restrito para uma análise quiral dos enantiômeros R-(+)-ABZ-SO e S-(-)-ABZ-SO.

Vale destacar também que a separação de enantiômeros de sulfóxidos quirais vem sendo bastante estudada em nosso grupo de pesquisa, onde a utilização de colunas de polissacarídeo tem se destacado na resolução de uma série de sulfóxidos quirais. <sup>80-85</sup> Essas fases, apesar de terem sido originalmente desenvolvidas para serem usadas no modo normal, também possuem poder de resolução no modo reverso de eluição <sup>80</sup>, apresentando grande versatilidade e aplicabilidade, com alto poder de discriminação quiral e reprodutibilidade.



## 1.2 – LEITE BOVINO: COMPOSIÇÃO, IMPORTANCIA ECONOMICA E NUTRICIONAL

O leite pode ser definido como uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado. É secretado pelas glândulas mamárias, sendo um alimento indispensável aos primeiros meses de vida dos mamíferos.

A composição do leite de vaca varia de acordo com a espécie, a raça, a individualidade, a alimentação, o tempo de gestação e outros fatores. Em volume, a água constitui o principal componente do leite, cerca de 87,5%, influenciando sensivelmente na densidade do leite, a qual é ligeiramente superior a da água, entre 1,028 e 1,033 g/mL; o restante, 12,5% de matéria seca total, compreende gordura (3,6%), lactose (4,5%), proteína (3%) e sais (0,7%). O valor energético é de 68 calorias. É ligeiramente ácido no estado natural com pH em torno de 6,50 – 6,65.<sup>85</sup>

Com relação ao aspecto nutricional, o leite é um importante alimento, sendo considerado como uma inesgotável fonte de nutrientes essenciais tanto para o crescimento de jovens e crianças, como para manutenção de uma vida saudável de adultos e idosos. Além do que, o valor nutritivo do produto tem sido potencializado através do seu enriquecimento com vitaminas, minerais, ômega<sup>a</sup> e ausência de lactose.<sup>86</sup>

Com relação a produção de leite, a FAO (Food and Agricultural Organization) divulgou em junho de 2007, a produção de leite mundial referente ao ano de 2006 e uma projeção para 2007, e embora ainda não tenha publicado novos dados, este último estimou a produção mundial em 2006 de 656,8 bilhões de quilos de leite (2,3% acima da de 2005) e projetou a de 2007 em 674,6 bilhões de quilos (**Tabela 1.6**).

---

<sup>a</sup> Ômega são ácidos graxos considerados essenciais para manutenção de uma vida saudável.

Este crescimento deve-se principalmente à contribuição isolada de países como Brasil, Argentina, China e Nova Zelândia. A tendência, de acordo com esses dados, é que este panorama continue a repetir nos próximos anos, com o crescimento se concentrando ainda mais em alguns poucos países, dentre os quais o Brasil deve continuar ocupando papel de destaque.<sup>87</sup>

**Tabela 1.6:** Leite - Produção mundial e dos principais países produtores.<sup>87</sup>  
(bilhões de quilos)

<b>Países</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
União Européia	146,9	145,5	154,5
Índia (1)	95,1	98,4	101,4
EUA	80,3	82,5	83,5
China	32,3	38,4	45,3
Federação Russa	31,1	31,2	31,4
Paquistão	29,7	30,6	31,8
Brasil	24,7	25,5	26,3
Nova Zelândia (2)	14,5	14,9	15,1
Ucrânia	13,7	13,3	13,4
Argentina	10,1	10,8	11,7
Outros países	163,9	165,7	160,2
<b>Mundo</b>	<b>642,3</b>	<b>656,8</b>	<b>674,6</b>

**Fonte:** FAO (Perspectivas Alimentarias - Junho/07).

(1) Campanha começa em abril do ano indicado.

(2) Campanha termina em maio do ano indicado.

Para o Brasil, o último dado oficial disponível é relativo ao ano de 2006. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção de 2006 alcançou 25,398 bilhões de litros, 3,2% acima da produção brasileira de 2005, de 24,621 bilhões de litros. É uma taxa de crescimento superior à mundial, que, segundo os números de junho da FAO, teria aumentado 2,3% de 2005 para 2006.<sup>87</sup>

Para 2007, embora ainda não existam estimativas sobre a produção nacional total, levando em consideração o crescimento do primeiro semestre na

quantidade de leite recebida por algumas indústrias inspecionadas, espera-se um crescimento mais expressivo do que o verificado em 2006 (**Tabela 1.7**).

**Tabela 1.7:** Leite - Produção destinada à industrialização - Brasil e principais estados (milhões de litros).<sup>87</sup>

Estado	2005	2006	Primeiro semestre		
			2005	2006	2007 <sup>1</sup>
Minas Gerais	4.700,9	4.694,9	2.271,9	2.326,4	2.359,4
Rio Grande do Sul	1.979,5	2.252,5	875,2	995,9	1.151,3
Goiás	2.036,9	2.166,6	1.005,2	1.070,9	1.092,9
São Paulo	2.299,9	2.113,7	1.148,6	1.048,6	1.038,5
Paraná	1.375,7	1.409,6	657,4	663,7	685,2
Santa Catarina	817,1	976,5	367,7	451,8	487,7
Rondônia	568,9	580,3	286,5	295,1	319,4
Rio de Janeiro	421,4	417,1	196,4	200,3	198,6
Mato Grosso	319,9	333,9	166,7	165,6	205,5
Bahia	325,3	284,2	156,1	171,4	136,9
Outros	1.439,0	1.440,5	719,6	712,3	801,9
<b>Brasil</b>	<b>16.284,3</b>	<b>16.669,7</b>	<b>7.851,4</b>	<b>8.101,9</b>	<b>8.477,3</b>

Fonte: IBGE - Pesquisa Trimestral do Leite.

(1) Dados preliminares.

De acordo com os índices apresentados, pode-se avaliar a importância da produção leiteira no cenário da produção agropecuária e seguramente afirmar que o aumento expressivo obtido na produtividade de leite é o resultado da adoção de novas técnicas, que propiciam melhora significativa na qualidade e na produtividade, além de grandes esforços realizados com pesquisas genéticas de

animais produtores; melhores condições adotadas de instalação para o rebanho e a qualidade na nutrição e na saúde dos animais.<sup>88, 89</sup>

Vale destacar que esses cuidados são resultados diretos da grande atenção que tem sido dada às questões relacionadas à qualidade e à segurança alimentar, onde o desenvolvimento de métodos de análise mais sensíveis e seletivos para o controle de qualidade desses alimentos têm contribuído significativamente para que o país possa continuar despontando neste setor produtivo e enfrentando os desafios provocados pela competitividade no mercado internacional.<sup>88, 89</sup>

### **1.3 – PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Um dos primeiros e mais difíceis passos necessários para a análise de fármacos em fluidos biológicos é a extração e limpeza (clean-up) do fármaco a partir da matriz biológica, sendo este um pré-requisito para todos os procedimentos analíticos. De um modo geral, a etapa de preparação da amostra é a que requer mais tempo e a que leva ao maior número de erros e, em consequência, deve fazer parte do método como um todo quando da validação do mesmo.<sup>90</sup>

Fluidos biológicos não devem ser injetados diretamente nas colunas analíticas comuns de CLAE uma vez que as proteínas presentes nas matrizes biológicas causam o entupimento e perda de eficiência das mesmas, devido a adsorção acumulativa no suporte. Para evitar a rápida deteriorização da coluna analítica, é necessário realizar um pré-tratamento da amostra antes da sua injeção no sistema cromatográfico; este pré-tratamento visa obter os analitos livre da presença de proteínas e da interferência dos compostos endógenos presentes na matriz biológica.<sup>90, 91</sup>

O pré-tratamento adequado a ser feito depende da matriz com a qual se está trabalhando, bem como a que se aplica o método. Um dos procedimentos usuais de preparação das amostras biológicas é a limpeza da matriz biológica através da precipitação dos interferentes com um solvente apropriado e envolve as seguintes etapas: <sup>90, 92</sup> precipitação e centrifugação das proteínas; extração dos analitos a partir do sobrenadante, utilizando solventes orgânicos; evaporação do solvente de extração; reconstituição dos analitos na fase móvel e, finalmente, injeção no sistema cromatográfico. Em muitos casos, entretanto, após a precipitação e centrifugação das proteínas, o sobrenadante é injetado no sistema cromatográfico.

Outros dois métodos amplamente utilizados são as extrações líquido-líquido ou extrações em fase sólida. <sup>92, 93</sup> No primeiro caso, a extração dos analitos é realizada pela partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente um aquoso e outro orgânico. A extração em fase sólida emprega cartuchos empacotados com sílicas derivadas ou não e baseia-se na retenção seletiva dos analitos de interesse presentes na matriz biológica.

As extrações líquido-líquido ou em fase sólida tornam-se muito interessante quando além da extração se faz necessário a concentração dos solutos. Por outro lado, tais métodos podem apresentar vários problemas como, por exemplo, falta de reprodutibilidade dos resultados, requerem um grande consumo de tempo, são de difícil automação e necessitam de grandes quantidades de solventes que muitas vezes são tóxicos. <sup>93</sup>

A etapa de preparação das amostras pode ser muitas vezes, um fator limitante no tempo total da análise. Deste modo, numerosos esforços têm sido realizados com o intuito de diminuir o tempo gasto com o pré-tratamento das amostras biológicas e minimizar as perdas do analito que muitas vezes estão presentes como traços.

Visando simplificar, economizar tempo e diminuir o manuseio de amostras, novos métodos de pré-tratamento, envolvendo a injeção direta de amostras biológicas no sistema de CLAE, estão sendo extensamente investigados.<sup>94-96</sup> Dentre esses métodos, o uso de colunas contendo fases de acesso restrito (RAM), ou seja, fases que permitem injeções diretas e repetitivas de biofluidos não tratados no sistema de CLAE<sup>91, 97-100</sup> têm se destacado.

Esses métodos são bastante vantajosos em pesquisa e análises clínicas, toxicológicas e farmacêuticas, devido a sua capacidade de reduzir o tempo e a mão-de-obra empregados no procedimento analítico.

### **1.3.1 – FASES DE ACESSO RESTRITO (RAM)**

O termo “fase de acesso restrito”, introduzido por DESILETS e colaboradores<sup>99</sup>, em 1991, expressa a acessibilidade limitada de macromoléculas aos sítios de adsorção interno do suporte poroso devido a sua elevada massa molecular.

O princípio fundamental das fases de acesso restrito é a presença de uma superfície hidrofílica, responsável pela exclusão não adsortiva de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos) no volume morto da coluna sem acumulação destrutiva, e de sítios hidrofóbicos onde as pequenas moléculas (fármacos e seus metabólitos) se ligam sendo retidas e separadas.<sup>101, 102</sup> Essas colunas, portanto, combinam os princípios da cromatografia de exclusão e de fase reversa ou de troca iônica, para produzir uma Cromatografia de Superfície Discriminante.<sup>100-104</sup>

Inicialmente, as fases RAM foram classificadas de acordo com o mecanismo de exclusão de macromoléculas. Esse mecanismo fundamenta-se em

uma barreira de difusão física, baseada no tamanho do poro da sílica utilizada, para evitar o acesso das macromoléculas ao interior dos poros, e/ou uma barreira de difusão química criada por uma rede de polímeros sintéticos/naturais ou proteínas, ligados covalentemente ou simplesmente adsorvidos a superfície do suporte, para evitar a difusão das proteínas.<sup>105</sup>

BOSS e RUDOLPHI<sup>101</sup> ampliaram essa classificação, considerando o tipo de grupo ligado na superfície interna e externa das partículas, subdividindo a classificação em quatro grupos como: fases de superfície bimodal e unimodal, ambas com barreiras de difusão química e física (**Figura 1.11**).

As fases de superfície bimodal são caracterizadas pela presença de uma região externa hidrofílica e outra interna hidrofóbica. Aqui estão agrupadas entre outras, as fases reversas imobilizadas com proteínas, as fases ISRP (internal-surface reversed-phase), ADS (alkyl-diol sílica) e SPS (semi-permeable surface)<sup>91, 99, 102-104, 107-114</sup> (**Figura 1.12**).

As fases de superfície unimodal apresentam ambas superfícies da sílica, externa e interna, com caracteres hidrofílicos e hidrofóbicos. Neste grupo estão incluídas as fases MMP/MFP (mixed-function phase) e SHP (shielded hydrophobic phase)<sup>101-117</sup> (**Figura 1.13**).

Fase RAM	Barreira de difusão	Topoquímica superficial	Tipo
	Física	Unimodal	A
	Física	Bimodal	B
	Química	Unimodal	C
	Química	Bimodal	D

**Figura 1.11:** Classificação das fases RAM. <sup>106</sup>



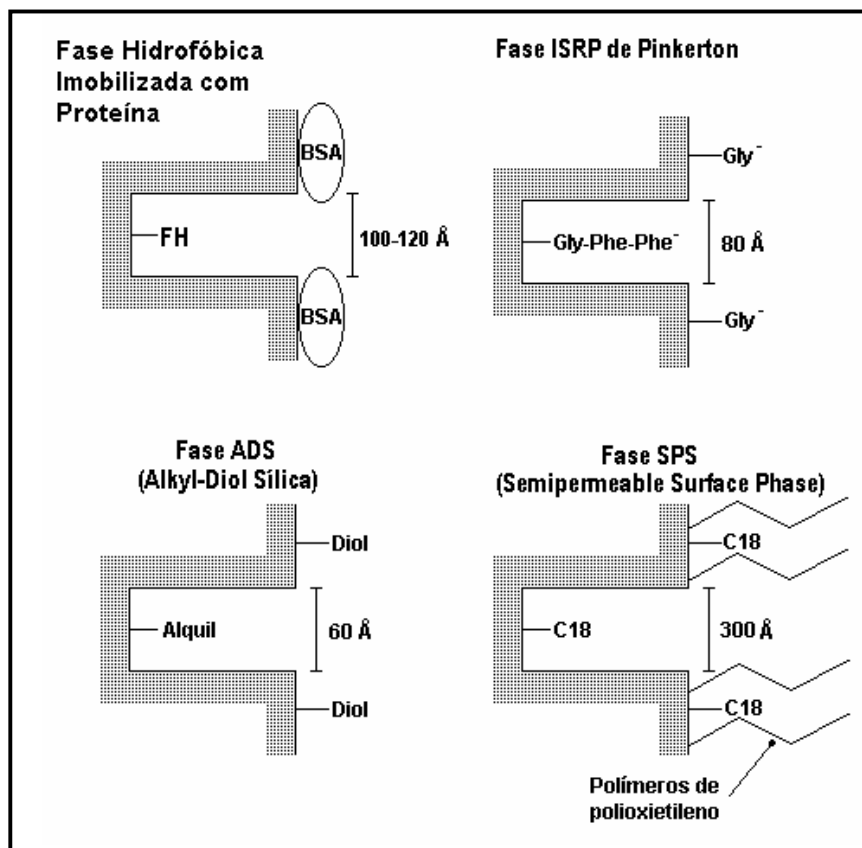


Figura 1.12: Representação esquemática das fases de acesso restrito bimodal. <sup>115</sup>

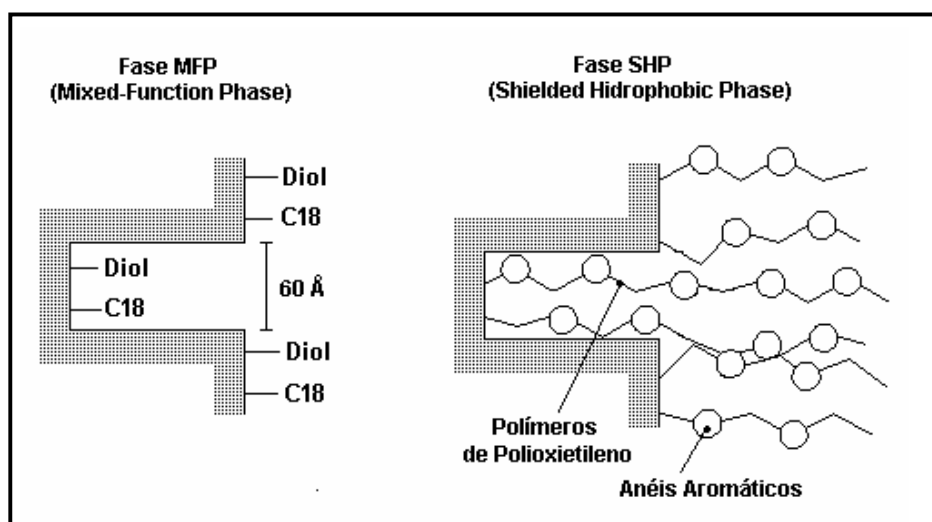


Figura 1.13: Representação esquemática das fases de acesso restrito unimodal. <sup>115</sup>

Dos diferentes tipos de suportes existentes, a coluna de fase de acesso restrito imobilizada com proteína tem sido utilizada com sucesso em nosso grupo de pesquisa para os mais variados tipos de amostras.<sup>56, 57, 118-123</sup> A superfície externa desta fase é hidrofílica, permitindo a exclusão de proteínas e os poros são hidrofóbicos o suficiente para reter os fármacos e seus metabólitos.

Essas fases foram primeiramente desenvolvidas por YOSHIDA e colaboradores<sup>104</sup>, em 1984, realizando simplesmente a saturação de sílica alquílicas (C<sub>18</sub>), com proteínas desnaturadas.

Mais recentemente, nesta mesma classe, MENEZES e colaboradores<sup>107-109</sup> desenvolveram as fases de albumina sérica bovina ou humana imobilizadas em suportes de sílica (C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>) e estabilizadas através de ligações cruzadas com glutaraldeído. Também nesta classe, vale destacar as fases de aminopropil-sílica conjugada com avidina.<sup>110,111</sup>

As colunas RAM possuem uma ampla gama de aplicação dentro das análises de fármacos e metabólitos em diversos tipos de matrizes biológicas, enquanto são também muito versáteis quanto à sua utilização, podendo ser aplicadas no modo simples ou no modo multidimensional de análise.<sup>100, 124, 125</sup>

No modo simples, as amostras não tratadas são diretamente injetadas no sistema cromatográfico, os interferentes são excluídos e os analitos permanecem retidos com posterior extração por eluição gradiente.<sup>100, 117, 124-126</sup> Desta forma, a coluna de acesso restrito funciona simultaneamente como coluna de exclusão e analítica.

MENEZES e FÉLIX<sup>107</sup> descreveram uma metodologia para a análise de pesticidas em leite utilizando as colunas RAM no modo simples de análise e; recentemente, FELIX e CAMPÈSE<sup>127</sup> desenvolveram uma nova coluna RAM-BSA quiral para análise dos fármacos oxazepam, lorazepam, temazepam, lormetazepam, em plasma humano. A superfície interna da nova fase RAM é

composta do seletor quiral de  $\beta$ -ciclodextrina e a superfície externa com BSA. Neste trabalho, foram obtidos excelentes resultados para a exclusão protéica e para a enantiosseletividade dos fármacos. A extensão para outros seletores quirais está sendo realizada, como  $\alpha$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas e antibióticos.

Na maioria dos métodos, as colunas de acesso restrito são utilizadas no modo multidimensional de análise como colunas extratoras acopladas a colunas analíticas aquirais<sup>56, 57, 94, 102, 106, 108, 120, 121, 123</sup> ou quirais<sup>118, 119, 122</sup>. As análises são então realizadas por um sistema de troca de colunas, onde a fração contendo o analito é transferida de uma coluna para outra através de uma válvula seletora. Nestes casos de acoplamento de colunas, com diferentes funções em um sistema cromatográfico, a cromatografia é denominada multidimensional.<sup>92</sup> Essa técnica é útil em análise de amostras com muitos constituintes, e pode ser utilizada para fracionar componentes ou possibilitar a determinação de um ou mais componentes específicos em misturas complexas.

Em geral, o uso de colunas RAM oferece várias vantagens em relação aos métodos de pré-tratamento *off-line*, entre elas a eliminação de várias etapas no pré-tratamento (precipitação de proteínas, centrifugação, evaporação do solvente, filtração), diminuindo erros de manipulação e perdas do analito; é totalmente compatível com sistemas automatizados, evitando manuseio de amostras perigosas ou infecciosas e aumenta significativamente o número de análises por tempo.<sup>120, 126, 127</sup>

SOUVERAIN e colaboradores<sup>124</sup>, MULLET<sup>125</sup> e CASSIANO e colaboradores<sup>105</sup>, em recentes revisões, descreveram métodos para a análise de fármacos em diversos tipos de fluidos biológicos, usando colunas de acesso restrito como colunas extratoras. De acordo com estes trabalhos é possível avaliar a grande aplicação do uso das colunas de fases de acesso restrito para a análise e quantificação de fármacos, por injeção direta, em diferentes matrizes complexas.

Foram relatados mais de 140 trabalhos na análise de fármacos em diversas matrizes biológicas, sendo estas: plasma, soro, lágrima, cultura de células, urina, bile, tecidos, secreção pulmonar, saliva, microdiálise e leite bovino.

No entanto, o desenvolvimento e a aplicação de métodos utilizando colunas de acesso restrito para a análise de compostos em leite é ainda muito restrito.<sup>105, 107-109, 115, 123</sup>

Deste modo, dentro deste contexto, o presente trabalho tem também por objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de fármacos no leite, por injeção direta de amostras em colunas RAM e emprego da cromatografia multidimensional, por acoplamento aquiral-aquiral e aquiral-quiral.

### **1.4 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESPALHAMENTO DE LUZ COMO DETECTORES NA ANÁLISE DE FÁRMACOS E METABÓLITOS POR CLAE**

#### **1.4.1 – LC-MS/MS**

A espectrometria de massas tem sido uma importante ferramenta no estudo do metabolismo e biodisponibilidade de fármacos, assim como seus produtos de biotransformação em organismos vivos.

Grande parte desses estudos eram tradicionalmente realizados por GC-MS, e na maioria dos casos havia a necessidade de preparo da amostra ou derivação do fármaco, a fim de torná-lo adequado para a análise em fase gasosa. Entretanto, o uso de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem crescido em importância com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de interfaces, que permitem o acoplamento das técnicas sem perda de eficiência e sensibilidade.<sup>128</sup>

O advento da ionização em fase líquida, como por exemplo, *electrospray*, tornou possível a aplicação de métodos LC-MS a moléculas de alta

polaridade. Deste modo, as técnicas de LC-MS têm sido aplicadas a uma ampla gama de produtos farmacêuticos<sup>11, 12-15, 27, 129</sup>, como anticancerígenos, anti-helmínticos, antibióticos, ansiolíticos, analgésicos, antiepiléticos, antagonistas de receptores, antioxidantes e  $\beta$ -bloqueadores; assim como compostos de grande massa molar que incluem peptídeos naturais e proteínas terapêuticas obtidas pela tecnologia de DNA recombinante.<sup>128, 129</sup>

As interfaces que utilizam técnicas de ionização a pressão atmosférica (API) são as que atualmente encontram as maiores aplicações; a maioria dos trabalhos descritos na literatura<sup>128-130</sup> utilizam ESI (*electrospray*) e APCI (*ionização química a pressão atmosférica*) na análise dos compostos de interesse por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

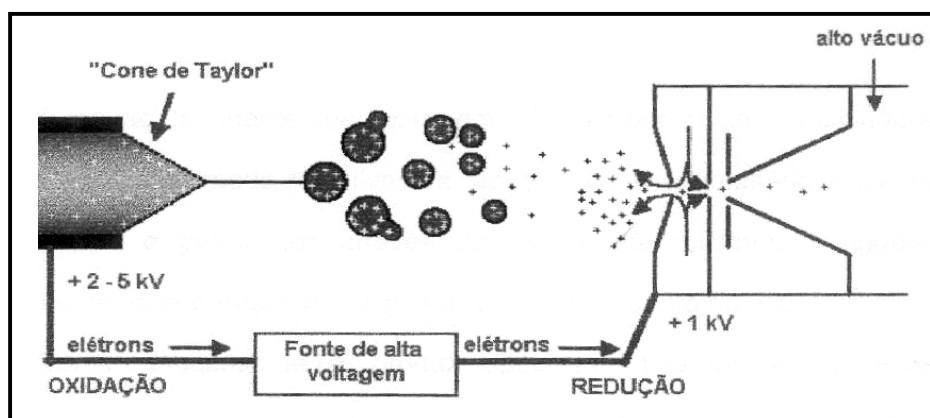
A seleção da interface apropriada para um dado analito é feita considerando-se que o ESI transfere íons da solução para a fase gasosa, enquanto que na APCI, a ionização ocorre em fase gasosa. Como regra geral, analitos que já estão ionizados em solução são melhores analisados por ESI, enquanto que, para analitos não-iônicos, a melhor escolha usualmente recai sobre a interface APCI.

De uma maneira geral, a ionização por *electrospray* pode ser dividida em três etapas: nebulização da solução da amostra em partículas eletricamente carregadas, liberação dos íons das gotículas, e transporte dos íons da região da fonte de ionização a pressão atmosférica para o vácuo e o analisador de massas do espectrômetro.

A solução da amostra é introduzida através de um tubo capilar submetido a um forte campo elétrico onde é criado um fino jato de gotículas altamente carregadas. O campo elétrico é gerado pela aplicação de uma voltagem diretamente ao capilar de entrada da solução, contra um eletrodo localizado a alguns milímetros da ponta do capilar; a voltagem aplicada fornece um gradiente

eletromagnético necessário para produzir a separação de cargas na superfície do líquido.<sup>129-132</sup>

Nessas condições, o líquido emergente assume um formato cônico; uma névoa de gotículas carregadas é ejetada da ponta do cone e atraída eletrostaticamente para o orifício da entrada do espectrômetro. Cada gotícula é carregada com várias unidades de carga, e enquanto elas decrescem de tamanho com a evaporação do solvente, a densidade de campo elétrico em sua superfície aumenta. A repulsão mútua entre as cargas na superfície torna-se tão grande que excede a força de tensão superficial, fazendo com que a gotícula se desintegre em várias outras de tamanho menor, que sofrerão o mesmo processo, até que restem apenas os íons da amostra, que serão levados ao analisador<sup>131</sup> (**Figura 1.14**).



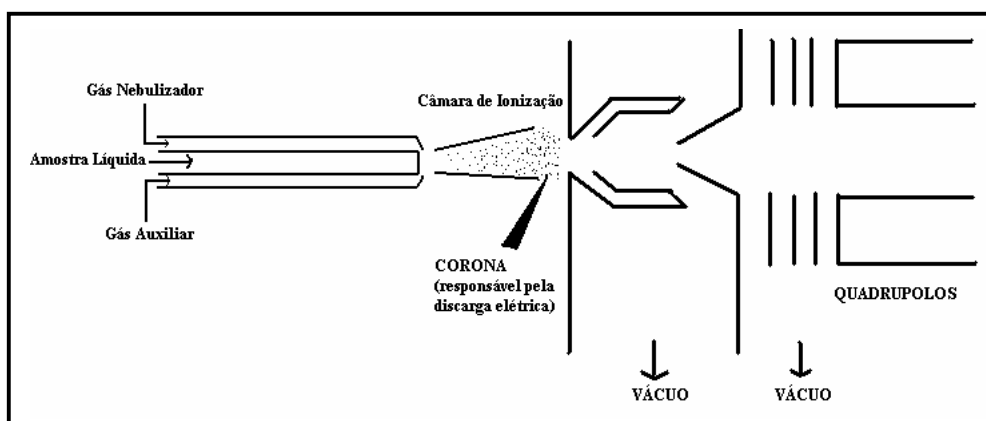
**Figura 1.14** – Mecanismo de funcionamento da técnica ESI.<sup>132</sup>

A intensidade do íon depende da sua estrutura e é afetado pela composição do solvente e presença de aditivos; já a abundância do íon em um intervalo de  $m/z$  é mais afetado pela eficiência do transporte, separação e detecção do íon. No entanto, para que não haja interferências na abundância e intensidade dos íons, a formação de um “spray” estável em ESI é fundamental. Variáveis como, voltagem aplicada, condutividade e tensão superficial do líquido devem ser cuidadosamente avaliadas.<sup>131, 132</sup>

Solutos de polaridade, volatilidade e massa molar moderada e não termolábeis podem ser determinados com grande sensibilidade com o uso da ionização química a pressão atmosférica (APCI). Nesta interface, a fase móvel vinda do sistema de HPLC é transformada em “spray” e rapidamente evaporada através de um fluxo de nitrogênio e do aquecimento do nebulizador a altas temperaturas (100-500 °C). Embora essas temperaturas possam degradar os analitos, a alta vazão da fase móvel e o fluxo coaxial de nitrogênio evitam a quebra das moléculas.<sup>132</sup>

Nesse modo de ionização, a amostra é ionizada devido à colisão com íons reagentes gerados a partir da fase móvel e uma descarga elétrica provocada na ponta de um filamento de aço, denominado corona, posicionado próximo à entrada da região de alto vácuo do equipamento (**Figura 1.15**). Esses íons são normalmente ricos em elétrons e a colisão do analito ocorre sem transferência de energia excessiva aos íons quase-molecular formados resultando em um menor grau de fragmentação.<sup>131, 132</sup>

A ionização das moléculas da amostra se dá na câmara de ionização por colisão com um excesso de íons reagentes, a uma pressão relativamente alta ( $10^{-3} - 10^{-2}$  atm). Os íons reagentes são geralmente positivamente carregados, e são gerados ou de um gás puro ou de uma mistura de gases.



**Figura 1.15** - Representação esquemática de uma interface do tipo APCI no sistema MS.

É importante ter em mente que na ionização via APCI, as reações químicas ocorrem em fase gasosa. O processo começa com a formação de íons  $N_2^+$  e  $O_2^-$  por meio de descargas contínuas da corona; estes íons então reagem com o solvente e com moléculas do analito. Devido ao tempo relativamente longo de permanência na fonte de APCI, os íons detectados são resultantes de processos de equilíbrio em fase gasosa.

A utilização do espectrometro de massas como detector em cromatografia surgiu como a solução de vários problemas principalmente relacionados a presença de interferentes na amostra, uma vez que a técnica oferece alta sensibilidade e seletividade, principalmente com o uso do artifício de monitoramento de reações múltiplas (MRM) na análise dos íons. No entanto, essa idéia vem sendo fortemente questionada.<sup>133</sup>

Embora a técnica de MRM ofereça a vantagem de monitoramento de fragmentos específicos de um único íon (alta seletividade), o processo de formação do íon, tanto em ESI quanto em APCI, pode sofrer interferências resultantes do meio em que se encontra. Compostos endógenos podem co-eluir com o composto de interesse quando o pré-tratamento da amostra é mínimo, combinado com um



baixo tempo de análise cromatográfica. Esses compostos, embora sejam invisíveis ao detector no modo MRM de análise, podem afetar significativamente a eficiência e reprodutibilidade do processo de ionização que acontece na interface LC-MS. Como resultado disso, o chamado efeito de matriz pode causar uma supressão ou até mesmo um aumento da ionização levando principalmente a problemas de precisão e exatidão dos métodos.<sup>134</sup>

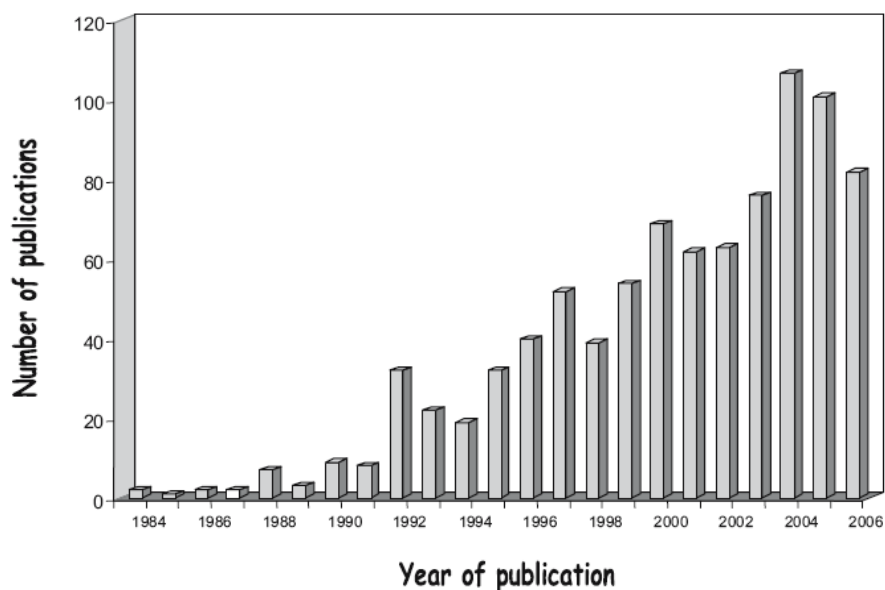
Uma vez que o efeito de matriz pode levar a erros analíticos significantes, guias de validação estabelecidos pelas diretrizes da União Européia e o FDA determinam que no caso de procedimentos baseados em LC-MS e LC-MS/MS, o efeito de matriz deve ser investigado para garantir precisão, seletividade e sensibilidade do método. No entanto, nenhum órgão é claro quanto ao procedimento que deve ser realizado para tal verificação.<sup>133-135</sup>

Deste modo, na análise de matrizes biológicas complexas, independente do detector a ser utilizado, é fundamental que a etapa de pré-tratamento seja realizada de forma a remover o maior número de interferentes presentes na amostra e a análise cromatográfica seja seletiva, para o sucesso do método.<sup>133-136</sup>

### **1.4.2 – LC - ELSD**

O detector de espalhamento de luz (ELSD-evaporative light scattering detector) foi desenvolvido em 1966 como uma alternativa aos detectores cromatográficos disponíveis na época, como UV-vis e índice de refração (RID). Apesar do alto potencial, o novo detector só começou a ser efetivamente utilizado no final dos anos 70 e atualmente têm sido extensivamente utilizado no desenvolvimento de métodos qualitativos e quantitativos de uma série de classe de compostos, especialmente aqueles que não apresentam grupos cromóforos.<sup>137</sup>

A **Figura 1.16**, mostra o resultado de um estudo realizado por LUCENA e colaboradores <sup>30</sup>, onde a crescente aplicação do ELSD em procedimentos analíticos pode ser verificada pelo aumento significativo do número de trabalhos publicados nos anos de 1978 a 2006.

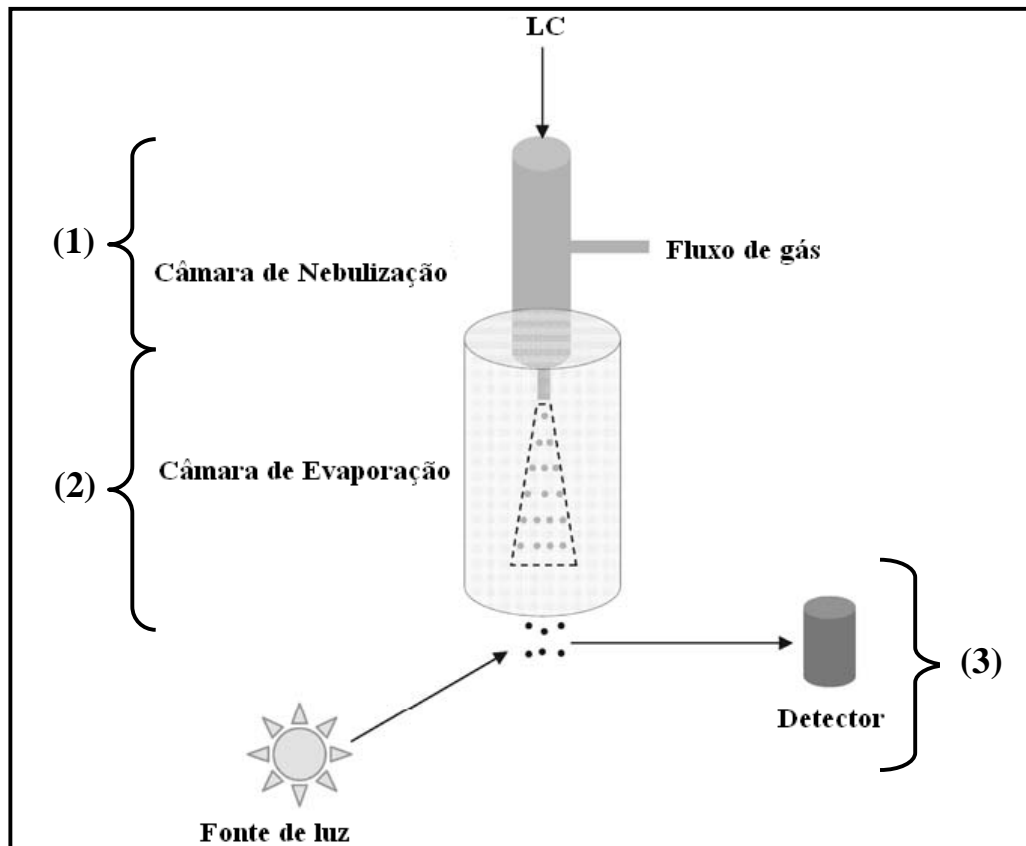


**Figura 1.16** – Variação no número de publicações com o uso do ELSD. <sup>30</sup>

Esse crescente número de trabalhos publicados se deve a aplicações diferentes das usuais dos detectores cromatográficos, uma vez que a resposta apresentada pelo ELSD permite, por exemplo, a determinação de respostas características para uma classe de compostos. <sup>30, 138-140</sup>

O detector de espalhamento de luz tem como princípio a nebulização da fase móvel com um gás inerte e evaporação do solvente para produzir pequenas partículas que serão detectadas em uma cela de espalhamento de luz. A intensidade da luz espalhada depende do tamanho das partículas formadas durante o processo de nebulização. <sup>29, 30, 137, 140</sup>

De uma maneira geral, o ELSD opera de acordo com três etapas bem definidas: nebulização (1), evaporação (2) e detecção (3) (**Figura 1.17**).



**Figura 1.17** – Princípio do detector de espalhamento de luz. Adaptado <sup>30</sup>

Na etapa de nebulização, a fase móvel vinda do sistema cromatográfico é volatilizada em um tubo aquecido com o auxílio de um fluxo de gás constante (nitrogênio ou ar comprimido), para a obtenção de um aerossol com pequenas gotículas. O aerossol é direcionado para a câmara de evaporação onde o solvente/fase móvel é evaporado para formar as partículas do analito de interesse. Essas partículas passam por uma cela óptica onde é incidido um feixe de luz, e provocam um desvio/espalhamento dessa luz o qual é medido por um tubo fotomultiplicador. A medida da luz é proporcional à quantidade de amostra na cela e não depende de um grupo funcional específico ou cromóforos. <sup>29, 30, 137, 139, 140</sup>

O espalhamento de luz é um processo complexo que envolve diferentes mecanismos; a interação da luz com as partículas vai depender do seu

tamanho, forma e propriedades superficiais. Quando a luz atinge a partícula, uma oscilação dos elétrons ocorre produzindo radiação. Se a partícula é perfeitamente homogênea, toda radiação emitida terá um efeito destrutivo dessa energia; entretanto, se a partícula não é homogênea, essa radiação é espalhada em outras direções.<sup>29, 30, 139, 140</sup>

O fenômeno de espalhamento de luz é geralmente descrito por quatro mecanismos denominados: espalhamento Rayleigh, espalhamento Mie, difração e reflexão. A importância relacionada a cada mecanismo é principalmente governada pelo tamanho das partículas ou mais propriamente pela proporção dos tamanhos das partículas ao comprimento de onda da luz emitida.<sup>29, 30</sup>

Devido às interações envolvidas, a relação entre a concentração do analito e o sinal produzido pelo ELSD não obedece a Lei de Beer, mas sim uma equação exponencial,  $I = km^b$ , onde  $I$  é a intensidade da luz,  $m$  a massa da partícula espalhada,  $k$  e  $b$  são constantes determinadas principalmente pela natureza da fase móvel e parâmetros do detector. Para facilitar o uso deste detector, a equação torna-se linear na forma logarítmica:  $\log I = \log k + b \times \log m$ .<sup>29, 30, 139</sup>

Várias são as aplicações cromatográficas, incluindo a determinação de resinas, polímeros, polietilenoglicóis, carboidratos, lipídeos, triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, adoçantes, aditivos de petróleo, agentes surfactantes, entre outras com o uso do espalhamento de luz como detector.<sup>29, 35-38, 141</sup> Em análises farmacêuticas esse detector também tem sido bastante utilizado principalmente em sistemas de triagem de substâncias, onde as amostras positivas são confirmadas por detectores mais seletivos e sensíveis como espectrometria de massas. São métodos qualitativos rápidos desenvolvidos para análise de grande quantidade de amostras com o intuito de reduzir o uso de técnicas analíticas sofisticadas e de alto custo.<sup>30</sup>

# OBJETIVOS

---

*"Não basta dar os passos que nos devem levar um dia aos objetivos,  
cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si,  
que ao mesmo tempo nos leva para adiante".*

VON GOETHE

## **2 – OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram:

1 – O preparo de colunas de acesso restrito (RAM), de albumina sérica bovina, imobilizadas nos diferentes suportes: octadecil e amino;

2 – A avaliação da eficiência das colunas RAM-BSA preparadas para a exclusão das proteínas do leite bovino;

3 – O desenvolvimento de métodos para a quantificação de antibióticos aminoglicosídeos em medicamentos veterinários, que possam ser utilizados como uma ferramenta no controle de qualidade desses medicamentos;

4 – O desenvolvimento de métodos por CLAE multidimensional aquiral-aquiral para a análise de antibióticos cefalosporínicos e aquiral-quiral para a análise de anti-helmínticos benzimidazólicos no leite, que possam ser utilizados na investigação de níveis máximos de resíduos permitidos em leite de consumo humano, assim como, para serem utilizados em estudos de monitoramento de eliminação destes fármacos no leite bovino.

# *PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL*

---

---

*"O conhecimento é um tesouro, mas a prática é a chave para obtê-lo."*

THOMAS FULLER

### **3 – PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 – GENERALIDADES**

As colunas cromatográficas utilizadas foram empacotadas no DQ – UFSCar, utilizando-se uma empacotadora SHANDON e as análises cromatográficas foram realizadas nos seguintes equipamentos:

1- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU uma bomba LC 10ATvp, com uma válvula seletora de solvente FCV – 10ALvp, um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD – 10Avp, um detector de índice de refração RID 10A e um alto injetor SIL 10AF. O equipamento está acoplado a uma interface SCL 10Avp e os cromatogramas são registrados através de um “software” CLASS-VP.

2- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU duas bombas LC 10AD, um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD – 10Avp, um detector de espalhamento de luz da marca Alltech e modelo 2000ES e um alto injetor SIL 10AF. O equipamento está acoplado a uma interface CBM 10A e os cromatogramas são registrados através de um “software” CLASS LC10.

3- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU duas bombas LC 10AD, um alto injetor SIL 10A, um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD – 10A, um detector de arranjo de fotodiodos modelo SPDM 10Avp, interface CBM 10A acoplados a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo, QuattroLC – Micromass. Os cromatogramas são registrados através de um “software” CLASS LC10 e MassLynxs.

4- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU com duas bombas LC 20AD, com uma válvula seletora de solvente FCV – 20AL, um degaseificador de membrana SHIMADZU DGU-20A5, um detector de ultravioleta



de comprimento de onda variável SPD – 20A, e um alto injetor SIL 20A. O equipamento está acoplado a uma interface CBM 20A e os cromatogramas são registrados através de um “software” CLASS-VP. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas ESQUIRE 6000 e os cromatogramas e espectros de massa são registrados e processados em um “software” Brucker Daltonics.

As medidas de absorção molecular na região do UV-visível para análise de exclusão de proteínas foram realizadas em um espectrofotômetro HP 8452A, utilizando-se uma cela de vidro de 10 mm de caminho óptico.

A água deionizada utilizada no preparo das soluções tampão para a composição das fases móveis foi obtida em um sistema MILLI-Q (MILLIPORE).

As medidas de pH foram feitas utilizando um pH-metro, QUALXTRON, modelo 8010, com precisão de  $\pm 0,01$ pH, calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (CHEMIS).

A pesagem dos reagentes foi feita em uma balança analítica AND, modelo HR200, com precisão de 0,0001 g. Utilizou-se também uma balança semi-analítica MARTE com precisão de 0,001 g.

Os antibióticos aminoglicosídeos foram gentilmente doados pela empresa veterinária Ouro Fino Produtos Veterinários Ltda (estreptomicina – 064K0564 – Sigma; neomicina – 3007040548 – Jebssen; gentamicina – 2010602050 – Sigma; canamicina – 104K0663- Sigma), os metabólitos Albendazol-Sulfóxido e Albendazol-Sulfona, foram preparados e gentilmente cedidos pela aluna Kátia Roberta Anacleto Belaz<sup>122</sup> e o albendazol-2-amino-sulfona 98% foi adquirido da LAN AESER.

O leite bovino utilizado para análise foi adquirido no comércio de São Carlos.

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram da marca GILSON. A centrifugação do leite bovino foi realizada em uma centrífuga JOUAN

B4i/BR4 i termostalizada e a homogeneização das amostras foi realizada em um agitador de tubos IKA.

Os solventes graus HPLC utilizados nas análises cromatográficas foram adquiridos da MALLINCKRODT, J. T. BAKER ou TEDIA. Todos foram filtrados a vácuo em um sistema MILLIPORE, utilizando-se membranas de nylon PHENOMENEX de 0,45  $\mu\text{m}$ , e posteriormente degaseificados em um ultra-som COLE-PALMER 8852 antes de serem utilizados. Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume.

Os demais reagentes químicos utilizados foram obtidos de diferentes fontes:

- ácido trifluoracético (TFA), pentafluorpropiónico (PFPA) e heptafluorbutírico (HFBA) da ALDRICH;
- acetato de amônio da MERCK;
- fosfato de potássio monobásico da CINÉTICA QUÍMICA;
- dihidrogênio fosfato de tetrabutílamônio da SIGMA;
- glutaraldeído 25% da ACROS;
- boroidreto de sódio da MERCK;
- albumina sérica bovina (fraction V powder minimum 98%) da SIGMA;
- corante *Coomassie Brilliant Blue* da MALLINCKRODT;
- ácido fosfórico (85% P. A.) da J. T. BAKER;

### **3.2 – PREPARO DAS COLUNAS RAM-BSA**

#### **3.2.1 – SÍLICAS UTILIZADAS**

As sílicas utilizadas no empacotamento das colunas foram: octilsílica (C<sub>8</sub>) LUNA (100Å, 10µm); octadecilsílica (C<sub>18</sub>) LUNA (120Å, 10µm); fenil-sílica LUNA (120Å, 5µm) e aminopropil-sílica LUNA (100Å, 10µm).

#### **3.2.2 – EMPACOTAMENTO DAS COLUNAS**

A sílica de fase hidrofóbica (1,0 g) foi suspensa em 30 mL de metanol, homogeneizada no ultra-som durante 2 minutos e empacotada em uma coluna de aço inoxidável (5 x 0,46 cm D.I.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas em metanol durante aproximadamente 4 horas a uma vazão de 1,0 mL/min.

#### **3.2.3 - IMOBILIZAÇÃO DAS FASES HIDROFÓBICAS COM BSA**

As colunas de fase de acesso restrito (RAM) foram preparadas de acordo com o procedimento estabelecido no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da UFSCar, baseado no protocolo de MENEZES e FELIX.<sup>107</sup>

Após o empacotamento e condicionamento das colunas, estas foram eluídas, a uma vazão de 1,0 mL/min, com solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 mol/L (pH=6,0) durante 20 minutos, solução de albumina 1,0 mg/mL preparada em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 mol/L (pH=6,0) durante 30 minutos, água durante 20 minutos e, em seguida, eluiu-se duas frações de 5 mL de glutaraldeído a 25% (v/v). Após

um repouso de 12 horas, uma solução de boroidreto de sódio 1,0 mg/mL foi eluída pela coluna até a obtenção de um eluente com valor de pH 10. Após mais duas horas em repouso, a fase estacionária foi, então, lavada com água Milli-Q durante 30 minutos e armazenadas na geladeira, numa temperatura entre 0-4 °C.

A coluna de fase de acesso restrito alquil-diol sílica (ADS) também avaliada neste trabalho para os antibióticos aminoglicosídeos, foi adquirida comercialmente (RP C<sub>18</sub> ADS (2,5 x 0,40 cm d.i.; 25 µm, 60 Å, Merck).

### **3.3 – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXCLUSÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE BOVINO PELAS COLUNAS RAM-BSA – MÉTODO DE BRADFORD<sup>142</sup>**

#### **3.3.1 – PREPARO DO REAGENTE DE BRADFORD**

A solução do corante azul brilhante, “Coomassie Brilliant Blue”, foi preparada na concentração 100 mg/mL, segundo o procedimento descrito por Bradford<sup>144</sup>. Em um béquer dissolveu-se 50,0 mg do corante azul brilhante em 25 mL de etanol e a seguir acrescentou-se 50,0 mL de ácido fosfórico. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água Milli-Q. A solução do corante foi estocada em um frasco de vidro âmbar.

#### **3.3.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS**

Após o condicionamento da coluna RAM com água a 1,0 mL/min durante 30 minutos, injetou-se 50 µL de leite integral, eluiu-se com água e coletou-se a primeira e a segunda fração de 2,00 mL em dois balões volumétricos. Em seguida, a coluna foi eluída com acetonitrila-isopropanol (90:10 v/v) por 10

minutos a 1,0 mL/min, para a limpeza de lipídeos, e condicionada com água por 30 minutos.

Este procedimento foi repetido para volumes de injeção de 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L, em triplicata, em todas as concentrações. As frações coletadas foram transferidas para frascos de vidro âmbar e guardadas na geladeira para posterior análise.

As soluções de referência foram preparadas adicionando-se volumes de 50, 100 e 200  $\mu$ L de leite bovino integral em um balão volumétrico de 2,00 mL e completando-se o volume com água. As soluções de referência não foram eluídas pelas colunas RAM-BSA e foram também armazenadas em frascos de vidro âmbar e guardadas na geladeira para posterior análise. Essas soluções representaram 100% das proteínas presentes no leite bovino.

### **3.3.3 – DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS**

Pipetou-se 250  $\mu$ L das amostras eluídas das colunas RAM-BSA, adicionou-se 5,00 mL da solução do corante azul brilhante e, com constante agitação, deixou reagir por três minutos. Em seguida, transferiu-se uma alíquota para uma cubeta de vidro e registrou-se o espectro na região de 190 a 820 nm. As absorvâncias foram medidas no comprimento de onda 595 nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante. O mesmo procedimento foi repetido para todas as frações coletadas, bem como para as soluções de referência.

A eficiência de extração foi calculada comparando-se as absorvâncias das amostras coletadas e as absorvâncias das soluções de referência, que fornecem a quantidade total de proteínas presentes no leite (100%).

### **3.4 - AVALIAÇÃO DO PODER DE RETENÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS PELAS COLUNAS RAM-BSA, ADS, FENIL E C<sub>18</sub>**

**3.4.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO E ACETATO DE AMÔNIO (0,01M); DOS ÁCIDOS TRIFLUORACÉTICO, HEPTAFLUORBUTÍRICO E PENTAFLUORPROPIÔNICO (0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,08 E 0,1M) E DA SOLUÇÃO DE TETRABUTILAMÔNIO 2MM**

#### **3.4.1.1 – SOLUÇÃO ACETATO DE AMÔNIO (0,01M)**

Para minimizar erros analíticos por se tratar de um sal higroscópico, foi preparada uma solução concentrada de 1,0 M, onde em uma balança semi-analítica, pesou-se 7,708g do sal e transferiu-o para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com água deionizada (MILLI-Q). Em seguida, utilizando-se um pipeta volumétrica uma alíquota de 10 mL foi transferida para um balão de 1000 mL para a obtenção de uma solução 0,01M do sal.

O pH da solução tampão foi então ajustado para 7,5 com a adição de uma solução de ácido acético (3,0 mol/L).

#### **3.4.1.2 – SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO (0,01M)**

A solução fosfato de potássio dibásico foi preparada pesando-se 1,361 g do sal e solubilizando-o em um volume total de 1000 mL de água. O pH da solução foi então ajustado para 7,5 com a adição de uma solução de ácido clorídrico (1,0 mol/L).

### **3.4.1.3 – SOLUÇÃO DE TETRABUTILAMÔNIO (2 mM)**

A solução de TBA foi preparada pesando-se 6,79 mg do sal em uma balança semi analítica e solubilizando-o em um volume total de 10,0 mL de solução fosfato de potássio (0,01M, pH 7,5).

### **3.4.1.4 – SOLUÇÃO DE TFA (0,005; 0,01; 0,05; 0,08 E 0,1M)**

A solução de TFA 0,1M foi preparada utilizando-se uma pipeta graduada, onde uma alíquota de 14,9 mL do ácido foi diluída em água deionizada para um volume final de 1,0 L de solução. A partir desta solução, diluições consecutivas foram realizadas para a obtenção das demais concentrações.

Para obtenção da solução 0,08 mol/L, foram aliqotados 200 mL e diluídos em água deionizada para um volume final de 250 mL. Do mesmo modo, a solução 0,05 mol/L foi obtida diluindo-se uma alíquota de 500 mL da solução 0,1 mol/L em água deionizada para um volume final de 1,0 L.

A partir desta solução (0,05 mol/L), foram aliqotados 200 mL e diluídos em água deionizada para um volume final de 1,0 L, para a obtenção da solução 0,01 mol/L. Para a obtenção da solução 0,005 mol/L, 250 mL da solução 0,01 mol/L foram aliqotados e dissolvidos em água deionizada para um volume final de 500 mL.

### **3.4.1.5 – SOLUÇÃO DE HFBA (0,005; 0,01; 0,05; 0,08 E 0,1M)**

A solução de HFBA 0,1M foi preparada utilizando-se uma pipeta graduada, onde uma alíquota de 13,0 mL do ácido foi diluída em água deionizada para um volume final de 1,0 L de solução.

A partir desta solução, as mesmas diluições realizadas para as soluções de TFA (**item 3.4.1.4**) foram utilizadas para o preparo das soluções de HFBA.

#### **3.4.1.6 – SOLUÇÃO DE PFPA (0,01; 0,025; 0,05; 0,075 E 0,1M)**

A solução de PFPA 0,1M foi preparada utilizando-se uma pipeta graduada, onde uma alíquota de 10,4 mL do ácido foi diluída em água deionizada para um volume final de 1,0 L de solução.

A partir desta solução, uma alíquota de 37,5 mL foi diluída em água deionizada para um volume final de 500 mL, para a obtenção da solução 0,075 mol/L. A solução 0,05 mol/L foi obtida a partir da solução 0,075 mol/L, onde uma alíquota de 200 mL foi diluída em um volume final de 300 mL de água deionizada. Do mesmo modo, a partir da solução 0,05 mol/L, 100 mL foram aliqotados e diluídos em 200 mL de água deionizada para a obtenção da solução 0,025 mol/L. A solução 0,01 mol/L foi obtida aliqotando-se 80,0 mL da solução 0,025 mol/L e diluindo em água deionizada para um volume final de 200 mL.

#### **3.4.2 – SOLUÇÕES PADRÃO**

##### **3.4.2.1 – AMINOGLICOSÍDEOS**

As soluções dos antibióticos aminoglicosídeos 100 µg/mL, foram preparadas dissolvendo 0,5 mg dos mesmos em água em um balão volumétrico de 5 mL.

As demais soluções de diferentes concentrações avaliadas, foram preparadas por diluições realizadas a partir de uma solução de 1,0 mg/mL, preparada dissolvendo-se 2,0 mg em água em um balão volumétrico de 2,0 mL.



### **3.4.2.2 – CEFACETRIL**

A solução do cefacetil de 500 µg/mL foi preparada a partir de uma solução 1,00 µg/mL, onde o volume de 100 µL foi dissolvido em água em um balão volumétrico de 2,00 mL; a solução de concentração 100 ng/mL foi preparada dissolvendo-se 10,0 µL da solução 500 µg/mL em água em um balão volumétrico de 5,00 mL. As demais soluções utilizadas foram preparadas a partir da solução de 500 µg/mL.

## **3.5 – MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICO**

### **3.5.1 – EMPACOTAMENTO DAS FASES ESTACIONÁRIAS**

#### **3.5.1.1 – COLUNAS AQUIRAS (C<sub>18</sub> e fenil)**

As sílicas C<sub>18</sub> e fenil (2,3 g), foram suspensas em 50 mL de metanol, homogeneizadas no ultra-som durante 2 minutos e empacotadas em uma coluna de aço inoxidável (15 x 0,46 cm d.i.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas em metanol durante aproximadamente 12 horas a uma vazão de 1,0 mL/min.

#### **3.5.1.2 – COLUNA QUIRAL**

A fase estacionária quiral (tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, adsorvida em APS Nucleosil (500Å, 7µm, 20% g/g) foi preparada no grupo pela aluna Kátia Roberta Anacleto Belaz de acordo com um procedimento já estabelecido no grupo<sup>122</sup> e gentilmente cedida para este estudo. A fase estacionária

(2,3 g) foi então suspensa em 50,0 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v), homogeneizada no ultra-som durante dois minutos e empacotada em coluna de aço inoxidável (15,0 x 0,46 mm d.i.) sob pressão de 7500 psi, utilizando-se hexano:isopropanol (90:10 v/v) como solvente.

A coluna foi condicionada em hexano:isopropanol (90:10 v/v) durante 12 horas, utilizando-se uma vazão de 0,8 mL/min. Após este período a coluna foi então convertida para o modo reverso de eluição, onde foi eluída durante 1 hora com isopropanol, seguida de uma mistura de acetonitrila:água (50:50) também durante aproximadamente 1 hora. Após este período a coluna foi armazenada em isopropanol para posterior uso.

### **3.5.2 – MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.5.2.1 – PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO**

##### **3.5.2.1.1 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO ESTREPTOMICINA**

De acordo com a porcentagem especificada no padrão utilizado para a validação do método, uma massa de 133,3 mg do padrão sulfato de estreptomicina foi precisamente pesada, dissolvida em uma solução de TFA 0,05M e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. A solução estoque preparada apresentou uma concentração de 10,0 mg/mL de estreptomicina.

As soluções padrão e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas, por diluição da solução estoque nas seguintes concentrações:

Soluções padrão de calibração: 0,500; 1,00; 1,75; 2,50; 3,00; 3,75; 4,50 e 5,00 mg/mL

Soluções padrão de controle de qualidade: 0,60; 2,0 e 4,0 mg/mL.

#### **3.5.2.1.2 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO NEOMICINA**

De acordo com a porcentagem especificada no padrão utilizado para a validação do método, uma massa de 154,8 mg do padrão sulfato de neomicina foi precisamente pesada, dissolvida em uma solução de TFA 0,050 M e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. A solução estoque preparada apresentou uma concentração de 10,0 mg/mL de neomicina total.

As soluções padrões e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas, por diluição da solução estoque nas seguintes concentrações:

Soluções padrão de calibração (concentração de neomicina total): 0,500; 1,00; 1,75; 2,50; 3,00; 3,75; 4,50 e 5,00 mg/mL

Soluções padrão de controle de qualidade (concentração de neomicina total): 0,60; 2,0 e 4,0 mg/mL

#### **3.5.2.1.3 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO GENTAMICINA**

De acordo com a porcentagem especificada no padrão utilizado para a validação do método, uma massa de 160,5 mg do padrão sulfato de gentamicina foi precisamente pesada, dissolvida em uma solução de TFA 0,050 M e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. A solução estoque preparada apresentou uma concentração de 10,0 mg/mL de gentamicina total.

As soluções padrões e as soluções padrões de controle de qualidade foram obtidas, por diluição da solução estoque nas seguintes concentrações:

Soluções padrão de calibração (concentração de gentamicina total): 0,500; 1,00; 1,75; 2,50; 3,00; 3,75; 4,50 e 5,00 mg/mL

Soluções padrão de controle de qualidade (concentração de gentamicina total): 0,60; 2,0 e 4,0 mg/mL

#### **3.5.2.1.4 – DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DO ANTIBIÓTICO CANAMICINA**

Uma massa de 20,0 mg do padrão de canamicina foi precisamente pesada, dissolvida em uma solução de TFA 0,050 M e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. A solução estoque preparada apresentou uma concentração de 2,00 mg/mL.

As soluções padrões e as soluções padrões de controle de qualidade foram obtidas, por diluição da solução estoque nas seguintes concentrações:

Soluções padrão de calibração: 0,1; 0,2; 0,35; 0,50; 0,60; 0,75; 0,90 e 1,0 mg/mL

Soluções padrão de controle de qualidade: 0,12; 0,40 e 0,80 mg/mL

Os valores de concentração das soluções padrão controle de qualidade de todos os métodos foram calculados como segue:

- 1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação a menor concentração da curva de calibração.
- 2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação a maior concentração da curva de calibração.
- 3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação a maior concentração da curva de calibração.

### **3.5.2.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE**

#### **3.5.2.2.1 – MÉTODOS ESTREPTOMICINA, NEOMICINA, GENTAMICINA E CANAMICINA**

Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da solução padrão apropriada foram pipetadas em tubos de ensaio e o volume ajustado para 1000  $\mu\text{L}$  com uma solução de TFA 0,050 M. As amostras foram então homogeneizadas em vórtex por 10 s e em seguida, alíquotas de 350  $\mu\text{L}$  foram transferidas para os *vials* do autoinjeter, tendo sido injetado um volume de 15  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

#### **3.5.2.3 – OBTENÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS**

A partir da solução estoque, as soluções padrão de calibração foram preparadas em triplicata, nas seguintes concentrações:

**a-) estreptomicina:** 0,10; 0,20; 0,35; 0,50; 0,60; 0,75; 0,90 e 1,0 mg/mL.

**b-) neomicina total:** 0,10; 0,20; 0,35; 0,50; 0,60; 0,75; 0,90 e 1,0 mg/mL.

**c-) gentamicina total:** 0,10; 0,20; 0,35; 0,50; 0,60; 0,75; 0,90 e 1,0 mg/mL.

**d-) canamicina:** 0,02; 0,04; 0,07; 0,10; 0,12; 0,15; 0,18 e 0,20 mg/mL

As curvas de calibração foram obtidas, através de regressão linear, considerando as áreas das bandas cromatográficas relativas às concentrações dos antibióticos, ambos em escala logarítmica. A linearidade foi verificada através do valor do coeficiente de correlação.

As condições cromatográficas utilizadas para obtenção das curvas analíticas foram:

a)- coluna: C<sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.; 120 Å, 10 µm);

b)- fase móvel: TFA (0,05M)/ MeOH (99:01 v/v) para a estreptomicina; TFA (0,05M) 100% para a neomicina e TFA (0,05M)/ CH<sub>3</sub>CN (97:03 v/v) para a canamicina e gentamicina;

As condições utilizadas no detector de espalhamento de luz foram:

c)- vazão: 1,0 mL/min;

d)- temperatura do tubo: 115 °C para a estreptomicina; 107 °C para a neomicina e 113,6 °C para a gentamicina e canamicina;

e)- vazão do gás: 3,2 L/min para a estreptomicina; 3,1 L/min para a gentamicina, canamicina, neomicina;

Para todos os métodos foi utilizado um ganho de 1.

### **3.5.2.4 – PARÂMETROS ANALÍTICOS AVALIADOS**

#### **3.5.2.4.1 – LINEARIDADE**

A linearidade foi avaliada de acordo com o coeficiente de correlação (r) obtido pelo cálculo de regressão linear a partir das curvas de calibração, construídas em escala logarítmica.

#### **3.5.2.4.2 – PRECISÃO E EXATIDÃO**

A precisão intradia e interdia e a exatidão foram avaliadas em três dias não consecutivos, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, as

quais foram preparadas em replicata (n=5) como descrito no **item 3.5.2.2**, A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

A exatidão do método foi também avaliada através do teste cego, onde foram preparadas, em triplicata, e analisadas, amostras de concentrações desconhecidas ao analista.

#### **3.5.2.4.3 – LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DETECÇÃO (LD)**

O LQ foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV), não excedeu o valor de 2 % (n = 5) e a exatidão (%) apresentou desvios não superiores a 5 % do valor nominal da concentração.

O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

### **3.5.3 – MÉTODO BIOANALÍTICO**

#### **3.5.3.1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DO ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub> E (±)-ABZ-SO**

Foram preparadas, individualmente, três soluções estoque em CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (50:50) na concentração de 1,0 mg/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, para ABZ-SO<sub>2</sub> e para o (±)-ABZ-SO, através da dissolução de 2,0 mg de cada composto em um balão volumétrico de 2,0 mL.

A partir destas soluções, foram obtidas, por diluição, uma solução estoque com os antibióticos combinados nas concentrações: 10 µg/mL de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 60 µg/mL de (±)-ABZ-SO e 30 µg/ml de ABZ-SO<sub>2</sub>.

As soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas por diluição da solução estoque com os antibióticos combinados, nas seguintes concentrações:

Soluções padrão de calibração: 0,160; 0,180; 0,200; 0,240; 0,280; 0,320; 0,360 e 0,400 µg/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 0,480; 0,540; 0,600; 0,720; 0,840; 0,960; 1,08 e 1,20 µg/mL para cada enantiômero do (±)-ABZ-SO e também para o ABZ-SO<sub>2</sub>.

Soluções padrão de controle de qualidade: 0,184; 0,260 e 0,380 µg/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 0,552; 0,780 e 1,14 µg/mL para a cada enantiômero do (±)-ABZ-SO e também para o ABZ-SO<sub>2</sub>.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa em torno de 110-120%, em relação a menor concentração da curva de calibração.

2- O controle de qualidade de concentração média em torno de 40-60%, em relação a maior concentração da curva de calibração.

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75-95%, em relação a maior concentração da curva de calibração.

### **3.5.3.2 - PREPARO DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE**

As amostras foram preparadas pipetando-se 50 µL da solução padrão apropriada, em uma série de tubos de ensaio. Foi adicionado a cada tubo, um



volume de 950  $\mu\text{L}$  de leite A desnatado, previamente centrifugado, ou  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  (50:50) (para avaliar a eficiência da extração das colunas RAM-BSA). As soluções foram homogenizadas por agitação em vórtex por 15 segundos. Alíquotas de 350  $\mu\text{L}$  foram transferidas para os *vials* do autoinjeter e um volume de 100  $\mu\text{L}$  foi injetado no sistema multidimensional de CLAE.

### 3.5.3.3 – OBTENÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS

As amostras de calibração foram preparadas em triplicata nas seguintes concentrações: 8,00; 9,00; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 e 20,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 24,0; 27,0; 30,0; 36,0; 42,0; 48,0; 54,0 e 60,0 ng/mL para cada enantiômero do ( $\pm$ )-ABZ-SO e também para o ABZ-SO<sub>2</sub>.

A equação da regressão linear e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados, considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração dos antibióticos.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas para obtenção das curvas analíticas:

#### **Bomba 1:**

0,00-5,00 min: fase móvel: 100% H<sub>2</sub>O (exclusão das proteínas pela coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.)); vazão de 1,0 mL/min

5,01-6,30 min: fase móvel: H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (60:40 v/v) (extração dos compostos da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

6,30-7,30 min: fase móvel: H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (60:40 v/v) (transferência dos compostos da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA para a coluna analítica); vazão de 1,0 mL/min

7,40-12,4 min: fase móvel: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:ISO (75:15:10 v/v/v) (limpeza da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

12,4-21,0 min: fase móvel: H<sub>2</sub>O (condicionamento da coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA); vazão de 1,0 mL/min

**Bomba 2:** vazão de 0,8 mL/min;

0,00-6,30 min: fase móvel: H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN (50:50 v/v) (condicionamento da coluna analítica tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15 x 0,46 cm d.i.));

6,30-7,30 min: fase móvel: H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN (60:40 v/v) (transferência dos compostos da coluna extratora para a coluna analítica);

7,30-21,0 min: fase móvel: H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>CN (60:40 v/v) (análise do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO), detecção por LC-MS/MS, analisador do tipo íon-trap.

### **3.5.3.4 - PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA VALIDAÇÃO DE FÁRMACOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS**

#### **3.5.3.4.1 - SELETIVIDADE**

Embora análises por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) sejam consideradas capazes de gerar respostas seletivas, a seletividade do método foi avaliada pelo monitoramento de transições específicas de cada molécula protonada, sendo elas: ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (240 → 198); (±)-ABZ-SO (282 → 240) e ABZ-SO<sub>2</sub> (298 → 266) e também através do estudo de efeito de matriz realizado.

#### **3.5.3.4.2 - EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO (RECUPERAÇÃO) E TRANSFERÊNCIA DOS ANALITOS**

A eficiência de extração dos analitos da matriz biológica foi avaliada utilizando-se as soluções de controle de qualidade, em replicatas (n=5).

Calculou-se o percentual de eficiência da extração das colunas RAM, por comparação dos resultados obtidos para as amostras controle, preparadas em leite bovino, com os obtidos com as amostras preparadas na fase móvel: H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (50:50 v/v) (n=5).

#### **3.5.3.4.3 - PRECISÃO E EXATIDÃO**

A precisão (intra e interdias) e a exatidão foram avaliadas em três dias não consecutivos, utilizando-se as amostras controle de qualidade do método, preparadas em quintuplicata. A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi calculada através da razão da média das concentrações encontradas e o valor médio das concentrações nominais, e foi expressa em porcentagem.

A exatidão do método foi também avaliada através do teste cego, onde foram preparadas, em triplicata, e analisadas, duas soluções de concentração desconhecida ao analista.

#### **3.5.3.4.4 - LIMITE DA QUANTIFICAÇÃO (LQ) E DETECÇÃO (LD)**

O LQ foi estabelecido como a menor concentração, cuja precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV), não excedeu o valor de 20 % (n = 5) e

a exatidão (%) apresentou desvios não superiores a 20 % do valor nominal da concentração.

O LD foi estabelecido como a menor concentração que apresentou um sinal três vezes maior que o ruído do detector.

#### **3.5.3.4.5 – ESTUDOS DE ESTABILIDADE**

A estabilidade das amostras foi verificada através da determinação das concentrações das amostras controle de qualidade, preparadas em triplicata, analisadas por interpolação com a curva de calibração. A precisão e exatidão obtidas nestas análises determinaram a estabilidade das amostras, onde foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram variabilidade de até 15%, conforme critério de aceitação do método.

##### **3.5.3.4.5.1 – ESTUDO DE ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO PADRÃO**

A estabilidade das amostras em solução foi avaliada por um período de 10 dias à temperatura ambiente. As amostras foram preparadas em uma mistura de água e acetonitrila na proporção de 1:1.

##### **3.5.3.4.5.2 - ESTABILIDADES APÓS CICLOS DE CONGELAMENTO E DEGELO**

As amostras de leite fortificadas com os metabólitos do albendazol, recém preparadas, foram analisadas, e posteriormente congeladas a -20°C. Após um período de 24 horas, as amostras foram degeladas à temperatura ambiente e

novamente analisadas. Este procedimento foi realizado mais duas vezes, sempre em intervalos de 24 horas para cada ciclo.

#### **3.5.3.4.5.3 - ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO**

As amostras de leite fortificadas com os metabólitos do albendazol, recém preparadas, foram analisadas, e posteriormente congeladas a -20°C. Após um período de 3, 5 e 7 dias, as amostras foram degeladas à temperatura ambiente e novamente analisadas. Os degelos foram realizados uma única vez.

#### **3.5.3.4.5.4 - ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO**

As amostras foram preparadas, analisadas recém-preparadas e após mantidas à temperatura ambiente por 6 horas. O período de 6 horas foi baseado no tempo excedente de duração do preparo das amostras para as injeções no estudo de interesse.

#### **3.5.3.4.5.5 - ESTABILIDADES DAS AMOSTRAS DURANTE A PERMANÊNCIA NO AUTO-INJETOR**

As amostras foram preparadas e analisadas após serem mantidas no auto-injetor por 10 horas. O período de 10 horas foi baseado no tempo excedente de duração das análises para a obtenção da curva analítica.

### **3.6 – ESTUDO DO EFEITO DA MATRIZ**

Uma bomba seringa Havard Apparatus (Holliston, MA, EUA) foi usada para os experimentos de infusão contínua. Para avaliar o efeito da matriz

sobre a ionização do composto de interesse, uma junção em “T” foi colocada entre o sistema de LC e a fonte de MS.

Soluções contendo separadamente os compostos de interesse na concentração de 500 ng/mL foram infundidas a uma vazão de 10  $\mu$ L/min. As amostras brancas das matrizes avaliadas e outras soluções testes isentas dos analitos, foram injetadas no sistema cromatográfico e a resposta foi monitorada continuamente para produzir um perfil do efeito de matriz.

# *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

---

---

*"A mente que se abre a uma nova janela,  
jamais volta ao seu tamanho original"*

ALBERT EINSTEIN

## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE COLUNAS RAM-BSA**

#### **4.1.1 - PREPARO DAS COLUNAS DE FASE HIDROFÓBICA IMOBILIZADAS COM PROTEÍNA**

O desenvolvimento de métodos para a análise de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos tradicionalmente inclui etapas de tratamento preliminar da amostra, como por exemplo, precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, etc. Em muitos casos tais procedimentos são os responsáveis por grande parte do tempo empregado em um método analítico e, além disso, o grande manuseio da amostra, assim como dificuldades na reprodutibilidade e possíveis decomposições das amostras podem ocasionar baixos níveis de recuperação dos analitos que se encontram em baixas concentrações.

O uso de injeção direta de amostras biológicas tem oferecido várias vantagens em relação aos métodos de pré-tratamento convencionais, tais como, economia de tempo, menor manuseio das amostras biológicas e volume reduzido de lixo químico gerado. Dentro desse contexto, as fases de acesso restrito foram desenvolvidas especialmente para análise de compostos de massa molar baixa em matrizes complexas, uma vez que esses materiais permitem a injeção direta de amostras não tratadas de fluidos biológicos sem o comprometimento do sistema cromatográfico.

Dentre as fases de acesso restrito disponíveis, as fases hidrofóbicas immobilizadas com albumina sérica bovina (BSA) e estabilizadas através de ligações cruzadas com glutaraldeído têm sido utilizadas em nosso grupo de pesquisa com

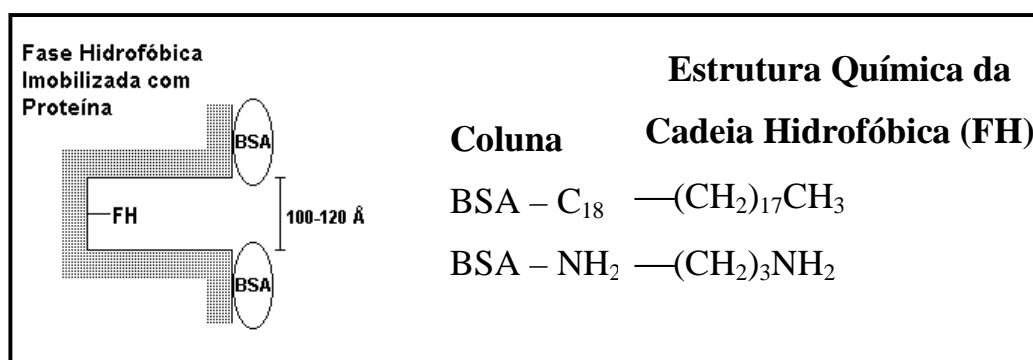


sucesso para as mais variadas matrizes biológicas, como por exemplo, plasma humano e bovino, leite e ovos de galinha poedeira.<sup>56, 57, 118-123</sup>

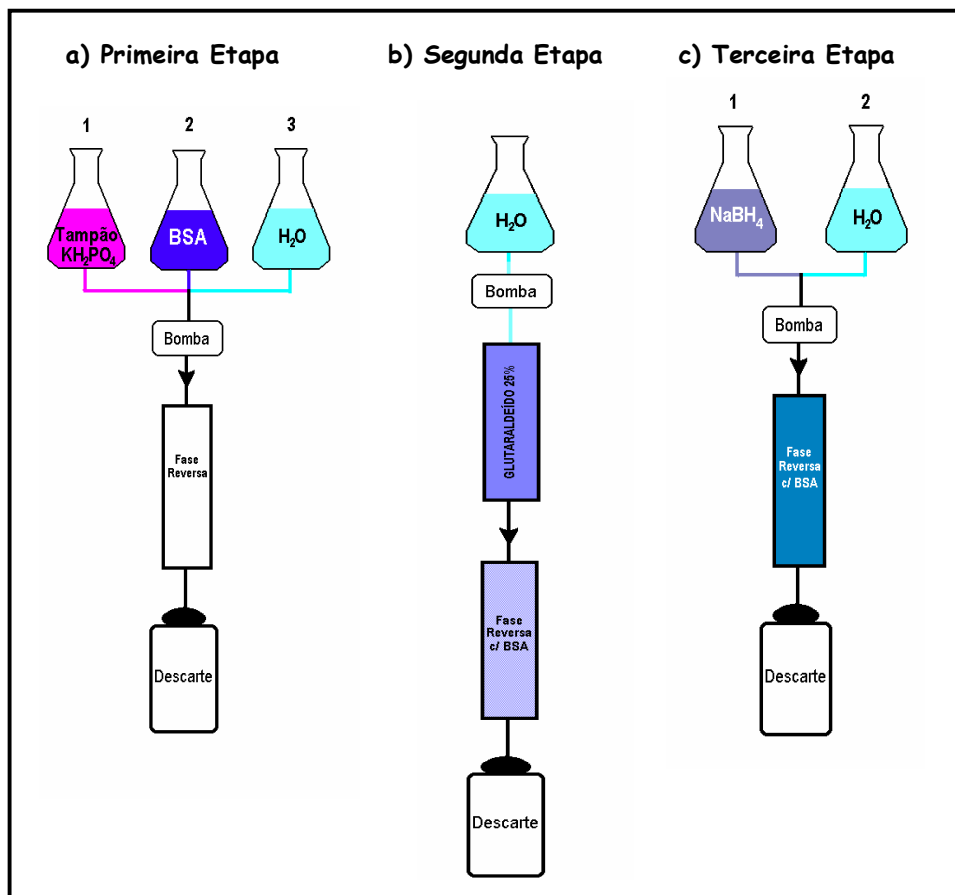
Deste modo, levando em consideração a experiência obtida no grupo, à fácil disponibilidade comercial da albumina sérica bovina, ao fácil preparo da fase, seu baixo custo e principalmente, às suas propriedades físico-químicas, a fase de acesso restrito de albumina sérica bovina foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho.

Nas fases reversas imobilizadas com proteínas, a superfície externa do suporte cromatográfico é saturada com proteínas, tornando-se hidrofílica e favorecendo assim a exclusão de macromoléculas como, por exemplo, proteínas, enquanto que a superfície interna do suporte mantém as características hidrofóbicas de modo reverso, onde os analitos de interesse são retidos. Nessas fases apenas a superfície externa do suporte é recoberta, uma vez que os pequenos poros da sílica não permitem o acesso das proteínas à superfície interna.<sup>105</sup>

As fases hidrofóbicas selecionadas (**Figura 4.18**) foram previamente empacotadas conforme protocolo do Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do DQ-UFSCar e as colunas extratoras do tipo RAM-BSA foram posteriormente preparadas com base no protocolo descrito por MENEZES e FÉLIX<sup>107</sup>, representado esquematicamente na **Figura 4.19**.



**Figura 4.18** – Fases hidrofóbicas imobilizadas com proteína; C<sub>18</sub>: octadecilsílica; NH<sub>2</sub>: aminopropilsílica; BSA: albumina sérica bovina.



**Figura 4.19** – Esquema representativo das etapas envolvidas na preparação das colunas RAM-BSA. <sup>106</sup>

A **Figura 4.19** apresenta um esquema das etapas realizadas no preparo das colunas RAM-BSA utilizadas neste trabalho. Na primeira etapa, inicialmente a coluna foi condicionada com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M; pH 6,0), e então albumina sérica bovina (BSA) foi imobilizada *in situ* na fase hidrofóbica (**Tabela 4.8**) através de cromatografia frontal. Após a imobilização da BSA, para promover as ligações intercruzadas entre as proteínas, em uma segunda etapa, a fase foi tratada com uma solução de glutaraldeído (25% v/v). <sup>106, 107</sup>

Para evitar possível hidrólise da dupla ligação da base de Schiff formada e evitar que os grupos aldeídos residuais reajam posteriormente com compostos analisados nas colunas, esse grupos foram em seguida, reduzidos com

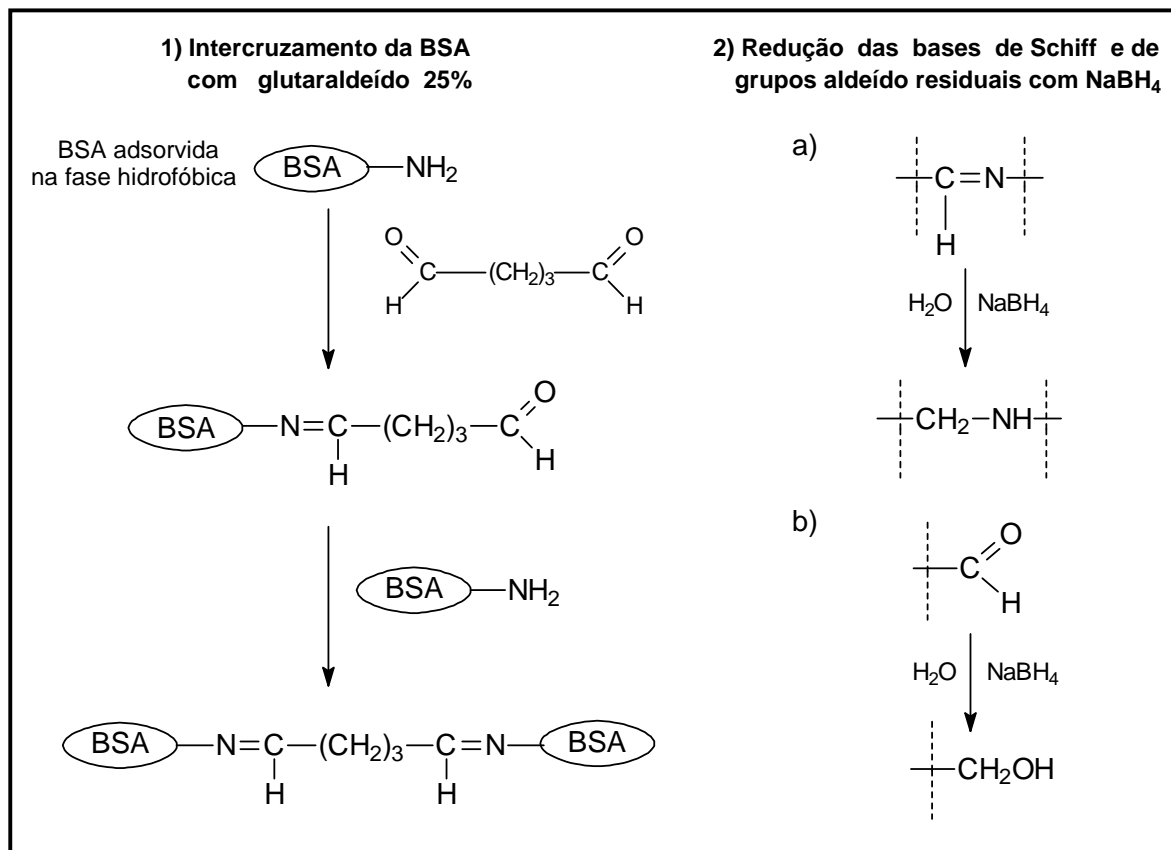
uma solução 1 mg/mL de borohidreto de sódio (terceira etapa da **Figura 4.19**). A **Figura 4.20** apresenta as reações envolvidas nas etapas do processo de imobilização e estabilização da BSA.

A reação de intercruzamento da proteína com o glutaraldeído, seguida de redução com borohidreto de sódio, confere maior estabilidade e durabilidade às colunas assim preparadas, uma vez que o intercruzamento evita a perda das proteínas, que pode acontecer quando esta está apenas adsorvida na superfície do suporte.

**Tabela 4.8:** Propriedades físico-químicas das fases estacionárias utilizadas para a preparação das colunas RAM<sup>a</sup>

<b>Sílica (Tipo)</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Tamanho de Partícula</b>	<b>Tamanho de Poro Å</b>
C <sub>18</sub>	Luna	10	120
NH <sub>2</sub>	Luna	10	100

<sup>a</sup> Dados fornecidos pelo fabricante.



**Figura 4.20** – Reações envolvidas na estabilização da BSA imobilizada em fases hidrofóbicas. <sup>106</sup>

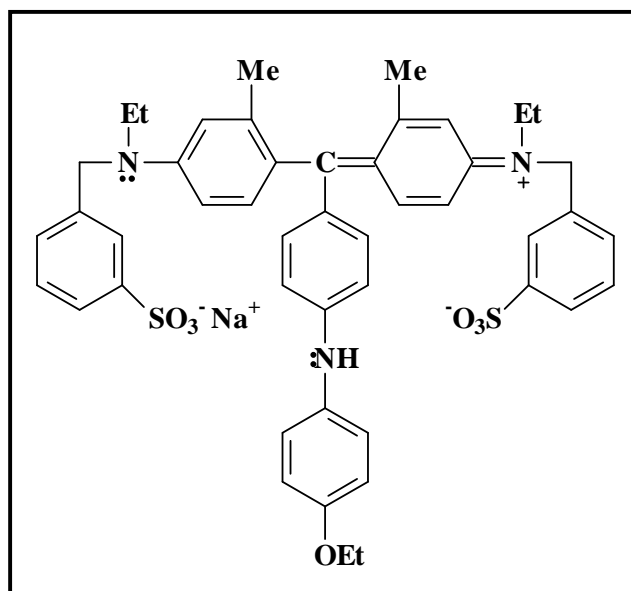
#### 4.1.2 – AVALIAÇÃO DO PODER DE EXCLUSÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE PELAS COLUNAS RAM-BSA

Vários métodos são empregados na determinação da concentração de proteínas totais em fluidos biológicos, entretanto, os mais utilizados são os métodos espectrofotométricos no ultravioleta visível. <sup>143</sup>

Baseado no trabalho de TANAKA e colaboradores <sup>111</sup>, e principalmente em trabalhos realizados no grupo para plasma humano <sup>105, 118-120</sup>, plasma bovino <sup>122</sup>, leite bovino <sup>56, 57, 123</sup> e ovos de galinha <sup>121</sup>, o método de BRADFORD <sup>142</sup> (ou Coomassie Brilliant Blue-CBBG-250) foi escolhido para avaliar a performance de exclusão protéica pelas colunas RAM-BSA.

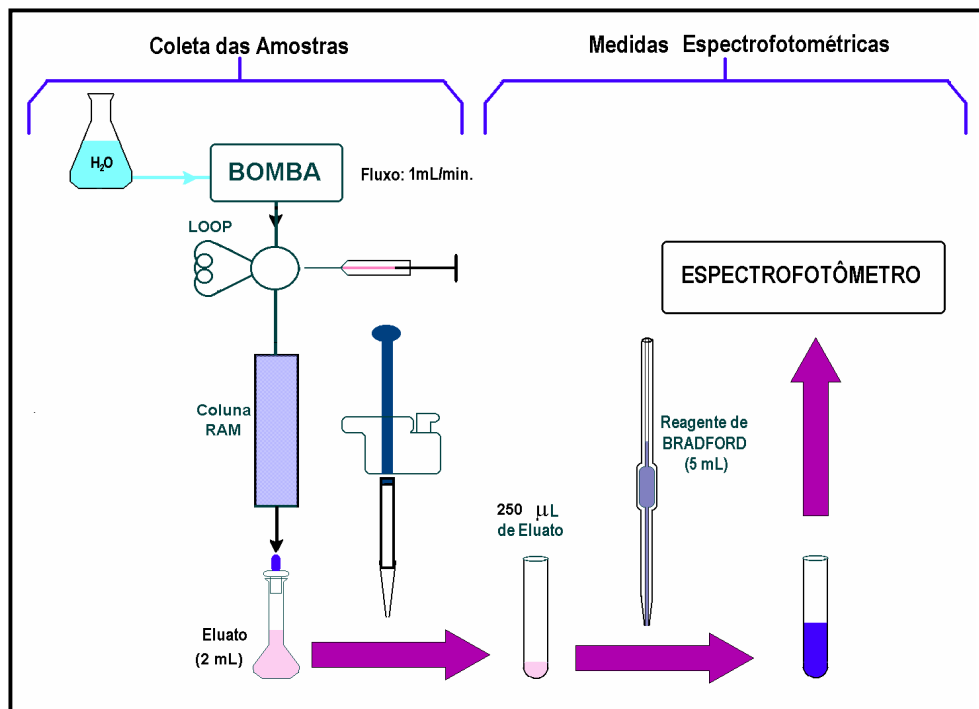
Esse método baseia-se nas interações de Van der Waals e hidrofóbicas entre corante CBBG-250 (**Figura 4.21**) e as proteínas de alta massa molar, que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas <sup>144</sup>, provocando um deslocamento na absorção de 465 para 595 nm, o qual é monitorado espectrofotometricamente. O método de BRADFORD é muito utilizado para a determinação de proteínas devido à sua alta sensibilidade, rapidez, baixo custo e especificidade para proteínas. <sup>143</sup>

A **Figura 4.21** mostra uma das estruturas de ressonância do corante CBBG-250. <sup>144</sup>



**Figura 4.21** – Uma das estruturas de ressonância do corante Coomassie Brilliant Blue (CBBG-250).

A **Figura 4.22** ilustra o procedimento realizado para as medidas de exclusão das proteínas do leite bovino pelas colunas RAM-BSA, descrito no Item 3.3 da parte experimental.



**Figura 4.22** - Procedimento realizado para avaliar a eficiência de exclusão das proteínas do leite bovino pelas colunas RAM-BSA. Adaptado da referência 106.

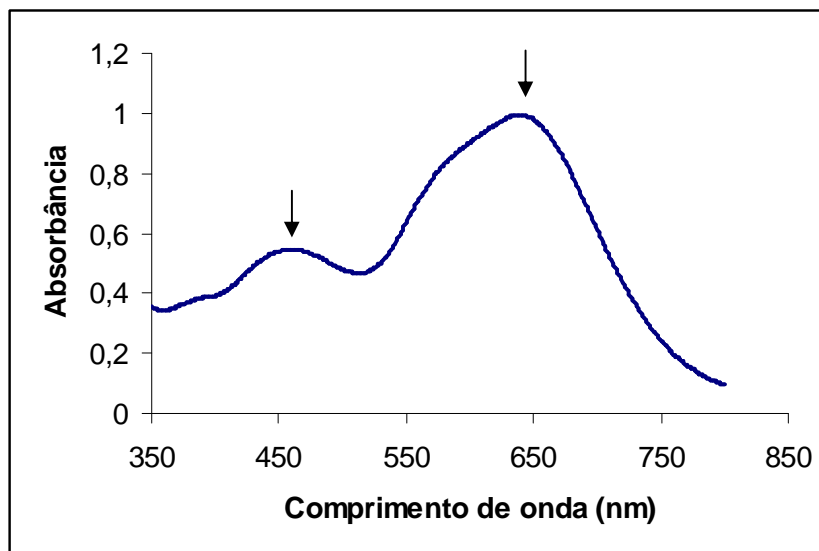
A avaliação da eficiência de exclusão das proteínas do leite pelas colunas RAM, foi analisada através da recuperação das proteínas. Esta recuperação foi calculada através das absorvâncias (em 595 nm) do complexo corante-proteína das soluções padrão de leite, que fornecem a quantidade total de proteína uma vez que elas não são injetadas na coluna, comparadas com as absorvâncias das frações de leite eluídas pelas colunas RAM-BSA, conforme procedimento descrito na parte experimental (Item 3.3).

A maioria dos estudos realizados em nosso grupo de pesquisa faz uso das colunas RAM-BSA com 10 cm de comprimento<sup>56, 57, 105, 118-123</sup>. LIMA<sup>106</sup> realizou um estudo para verificar a influência do tamanho da coluna RAM-BSA na capacidade de exclusão das proteínas para amostras de plasma humano. De acordo com esse estudo, foi verificado que o tamanho da coluna não apresentou diferenças

significativas na eficiência da exclusão das proteínas. Tanto a coluna de 4 cm avaliada, quanto a coluna de 10 cm apresentaram uma eficiência de exclusão das proteínas de plasma humano em torno de 99%. Deste modo, no intuito de avaliar diferenças com relação ao tamanho dessas colunas na exclusão das proteínas do leite, foram preparadas colunas de 5 cm de comprimento para este estudo.

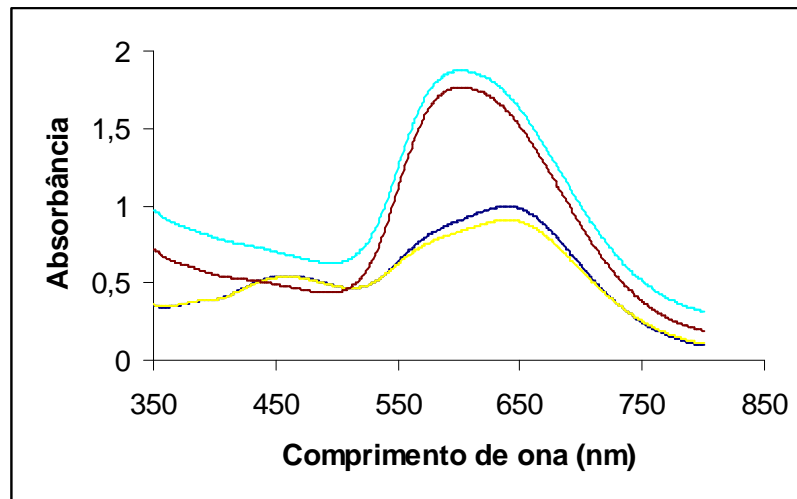
Os resultados obtidos mostraram que tanto a eficiência quanto o tempo de exclusão para as colunas de 5 cm foram muito similares aos da coluna de 10 cm para as proteínas do leite bovino.<sup>56, 57</sup> A vantagem da utilização das colunas de 5 cm para o desenvolvimento de métodos de análises por injeção direta de amostras é o ganho de tempo durante as análises.

Na **Figura 4.23** é apresentado o espectro de absorção do corante na região de 350-820 nm. Conforme pode ser observado, há bandas bem definidas com máximos de absorção em 460 e 640 nm correspondentes às formas catiônica e neutra do corante, respectivamente.<sup>144</sup>



**Figura 4.23** – Espectro do corante “Coomassie Brilliant Blue”.

A **Figura 4.24** apresenta os espectros de absorbância correspondente às frações coletadas das colunas RAM-BSA C<sub>18</sub> reagidas com o corante (BBG-250), da amostra padrão e do corante (BBG-250) para o volume de injeção de 100 µL.



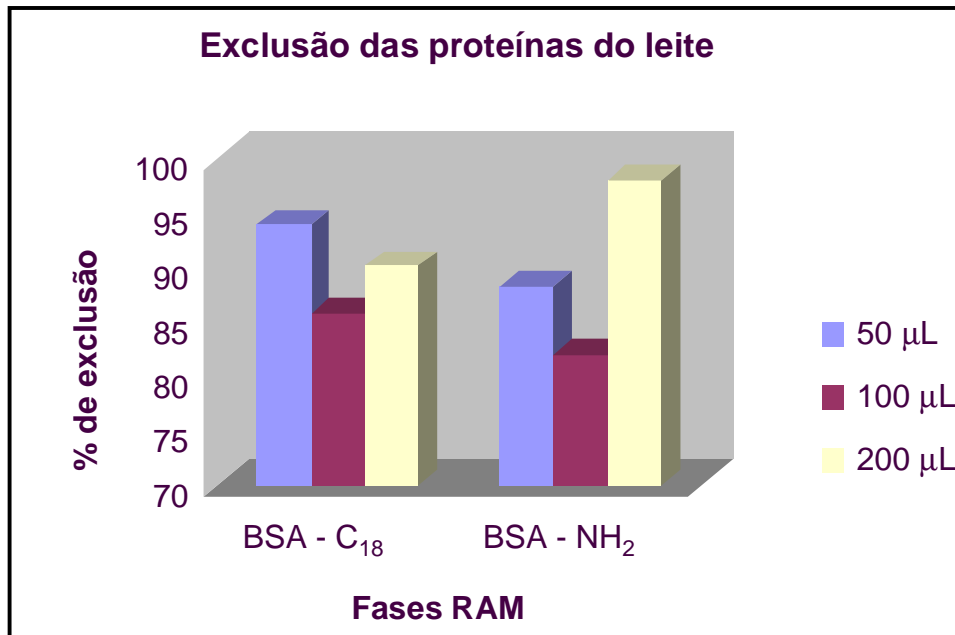
**Figura 4.24** – Espectros obtidos: **Azul (a)** - amostra padrão; **Vermelho (b)** - corante-proteína da primeira fração (2 min) de leite eluído da coluna extratora C<sub>18</sub>; **Azul (c)** - reagente; **Amarelo (d)** - corante-proteína da segunda fração (4 min) de leite eluído da coluna extratora C<sub>18</sub>.

Os resultados obtidos para as duas colunas RAM-BSA (**Figura 4.25**), apresentam excelente poder de exclusão para proteínas do leite, com uma performance de exclusão em média de 91%. De acordo com esses resultados, pode-se inferir que 10% das proteínas que não foram excluídas podem estar ficando adsorvidas nas fases estacionárias ou ainda nos *frits* das colunas cromatográficas, conforme já reportado por YU et al.<sup>98</sup>

De acordo com estes autores, após um determinado número de injeções de fluidos biológicos, há a necessidade da limpeza dos frits ou até mesmo a sua substituição, para eliminar problemas de elevação da pressão do sistema cromatográfico, perdas da precisão dos tempos de retenção e da simetria das bandas



cromatográficas dos analitos de interesse. Segundo os autores, a adsorção acumulativa de proteínas e/ou gorduras nos frits leva ao surgimento de um volume morto, após um determinado volume de injeção na coluna.

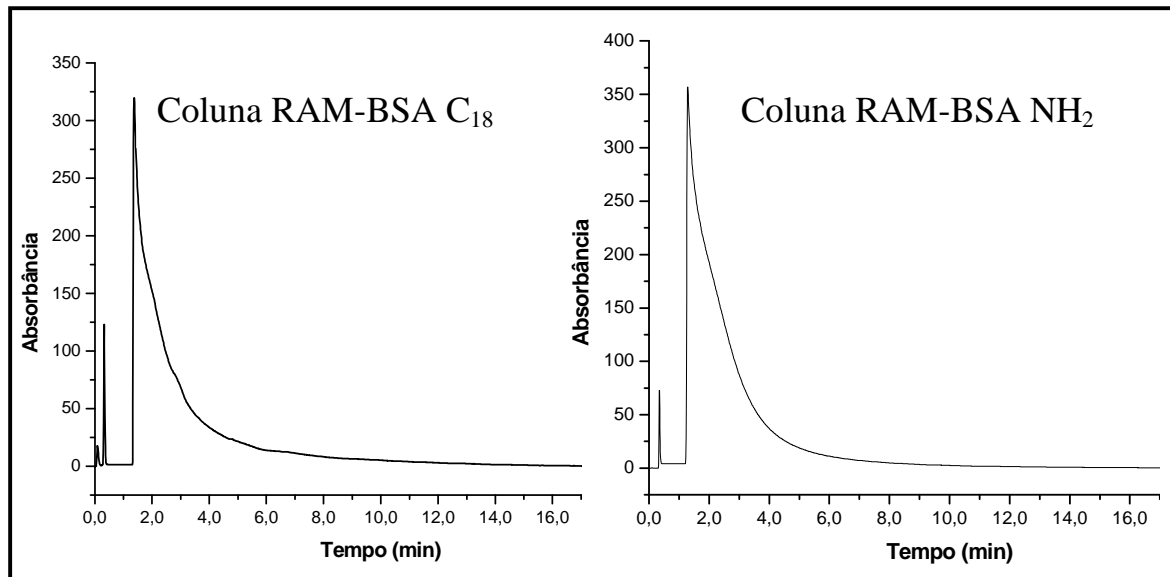


**Figura 4.25** – Porcentagem de proteínas excluídas pelas colunas RAM-BSA C<sub>18</sub> e amino.

Embora as linhas de base dos espectros apresentados na **Figura 4.23** não estejam corrigidas, é importante destacar que, o espectro correspondente à amostra corante-proteína da segunda fração eluída do leite (2-4 min), é muito similar ao próprio espectro do corante. Isto sugere baixa concentração de proteína nesta fração que foi coletada após 2 minutos de eluição, sendo este resultado observado independente do volume de injeção do leite.

Entretanto, observando-se o cromatograma de exclusão para ambas as colunas, é possível observar, até 4 minutos de análise, eluição de macromoléculas. A **Figura 4.26** mostra os perfis de exclusão apresentados pelas colunas RAM-BSA C<sub>18</sub> e amino para as amostras de leite utilizando água como fase móvel, com vazão

de 1,0 mL/min e  $\lambda = 280\text{nm}$  (absorbância dos aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina das proteínas) para o volume de injeção de 200  $\mu\text{L}$ .



**Figura 4.26** – Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando as colunas RAM-BSA Amino e C<sub>18</sub>. Condições Cromatográficas: Fase Móvel: H<sub>2</sub>O; vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ .

É importante destacar que, embora a avaliação do perfil cromatográfico de exclusão tenha sido realizado utilizando um comprimento de onda de máxima absorção dos principais aminoácidos das proteínas, os resultados obtidos não podem ser inferidos apenas às proteínas do leite, uma vez que outras substâncias presentes no meio com absorbâncias em 280 nm podem contribuir com a resposta obtida pelo detector. Deste modo, o uso da expressão exclusão de macromoléculas foi preferida à exclusão de proteínas do leite.

Nesta avaliação de exclusão foi escolhida água sem quaisquer aditivos para ser utilizada como fase móvel, uma vez que há trabalhos no grupo que empregam com sucesso essas condições cromatográficas na análise de fármacos em plasma humano por injeção direta de amostras, utilizando-se uma coluna BSA-C<sub>8</sub> como coluna extratora.<sup>118-119</sup> Embora a **Figura 4.26** apresente cromatogramas onde

é possível detectar a eluição de compostos até 4 minutos, pode-se afirmar que as colunas RAM-BSA são extremamente satisfatórias no que diz respeito a sua utilização como colunas extratoras no desenvolvimento de métodos analíticos em CLAE por injeção direta de amostras biológicas, uma vez que apenas água em vazão de 1,0 mL/min, durante 4 minutos, foi suficiente para uma exclusão de 90% das proteínas do leite, de acordo com as medidas realizadas pelo método de Bradford.<sup>142</sup>

Para essas fases imobilizadas com BSA desnaturada, a boa exclusão de proteínas indica que a BSA é hidrofílica o suficiente para excluir proteínas nestas condições cromatográficas, ou seja, a BSA permanece negativamente carregada por possuir um ponto isoelétrico de 4,8 e, através de interações repulsivas, exclui as proteínas do leite. Aqui é importante salientar que no leite as proteínas mais abundantes são k-caseína,  $\alpha_{S2}$ -caseína,  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobina B e A e que essas proteínas apresentam um ponto isoelétrico de 4,6 a 20 °C<sup>145</sup> e, portanto também se encontram negativamente carregadas quando se usa água como fase móvel.

No desenvolvimento dos métodos de análises por injeção direta, a composição da fase móvel deve ser mantida considerando o pH e força iônica apropriados de maneira a prevenir a precipitação de proteínas<sup>146</sup>. A superfície de contato entre proteína e água constitui uma interface onde há, naturalmente, uma tensão superficial, conseqüentemente as proteínas adquirem uma forma globular para minimizar esta energia superficial, ou seja, a proteína se encontra em um estágio chamado de nativo.

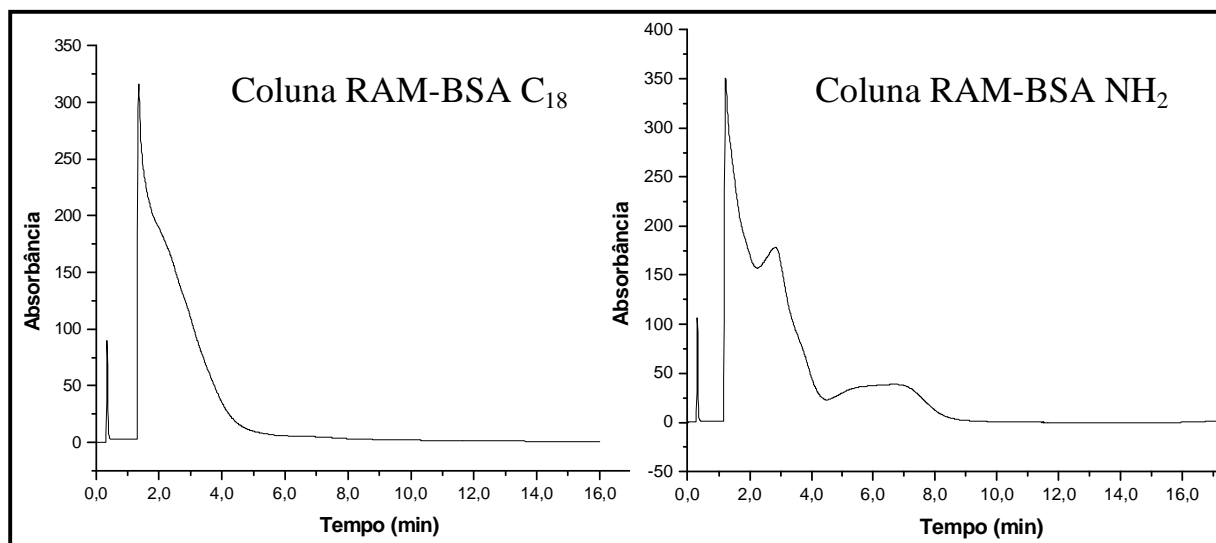
A presença de aditivos, como por exemplo, sais inorgânicos em uma determinada concentração, aumentam a tensão superficial, obrigando a proteína a permanecer no seu estado nativo. Nesta situação o aditivo se encontra excluído da camada superficial em torno da proteína, devido à repulsão entre as proteínas no

estado nativo e os sais presentes, e a proteína se encontra bem mais solúvel por estar rodeada majoritariamente pelas moléculas de água.

Quando a concentração de sal é aumentada, a tensão superficial também aumenta e as proteínas se agregam para reduzir sua área superficial acessível ao solvente (água + sal), resultando em uma precipitação induzida por sal (efeito “salting-out”).<sup>147</sup>

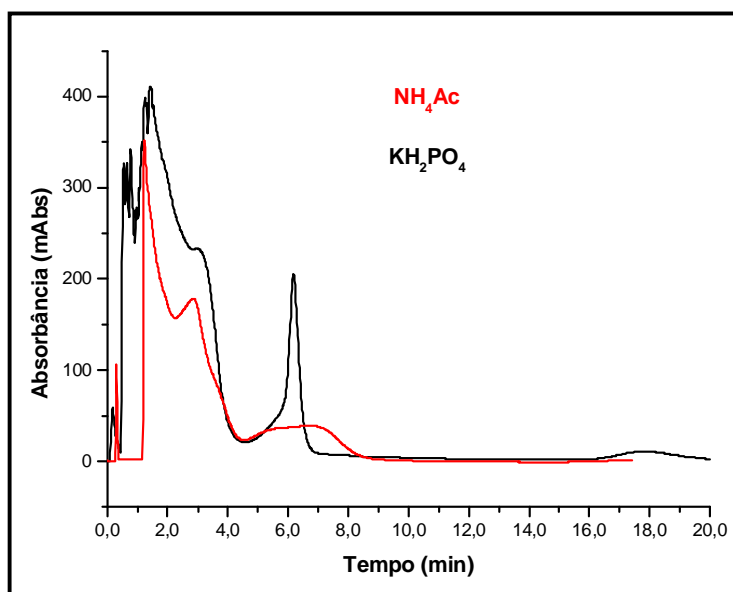
A primeira etapa deste efeito, ou seja, quando a proteína se encontra mais solúvel, com pequenas percentagens de sal e circundada por água, é algumas vezes, essencial para exclusão de proteínas por colunas hidrofóbicas imobilizadas com proteínas.<sup>111</sup> Deste modo, para verificar a influência da presença de sais na fase móvel para a exclusão das proteínas, foi avaliado também o perfil de exclusão utilizando solução acetato de amônio e fosfato de potássio dibásico ambos 0,01M e com pH ajustado para 6,5, onde não influenciaria na precipitação de proteínas e também não seria prejudicial ao suporte cromatográfico.

Para a coluna RAM-BSA com suporte C<sub>18</sub> uma discreta melhora pode ser observada com o alcance mais rápido da linha de base até 5 minutos de análise utilizando-se a solução de acetato de amônio. Já para a coluna RAM-BSA no suporte aminopropil uma alteração significativa no perfil de exclusão das macromoléculas pode ser observado. Este comportamento provavelmente se deve a interações promovidas pela solução de acetato de amônio, entre os grupos amino do suporte e as proteínas a serem excluídas. A **Figura 4.27** apresenta os perfis de exclusão observados.



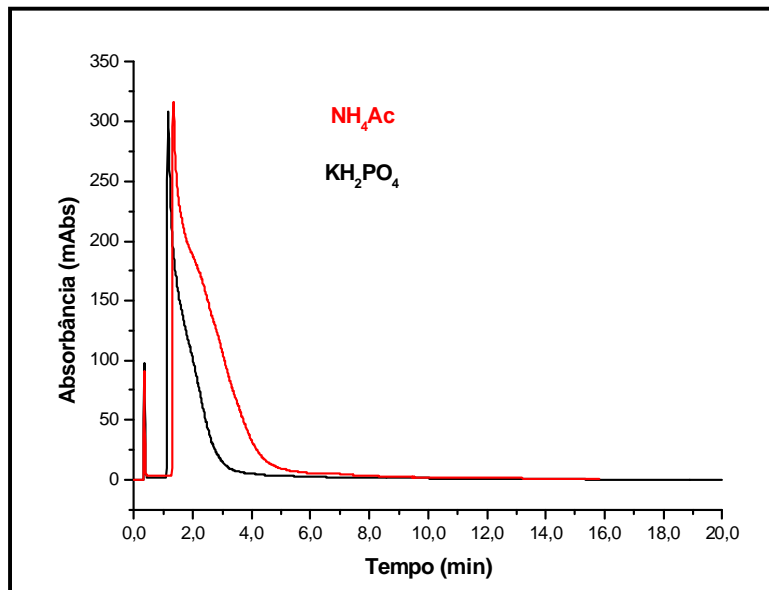
**Figura 4.27** - Perfil de exclusão das macromoléculas das amostras de leite utilizando as colunas RAM-BSA Amino e C<sub>18</sub>. Condições Cromatográficas: Fase Móvel: NH<sub>4</sub>Ac (0,01M, pH = 6,5); vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200  $\mu$ L.

Os resultados apresentados pela coluna RAM-BSA-NH<sub>2</sub> utilizando solução fosfato de potássio também não foram satisfatórios, uma vez que uma baixa eficiência de exclusão das macromoléculas foi observada. Os cromatogramas comparativos são apresentados na **Figura 4.28** e a presença tanto de um sal orgânico quanto a de um sal inorgânico mostram exclusão de macromoléculas em períodos de até 8 minutos.



**Figura 4.28** - Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando a coluna amino-BSA para as soluções de acetato de amônio e fosfato de potássio (0,01M, pH=6,5). Condições cromatográficas: vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200  $\mu$ L.

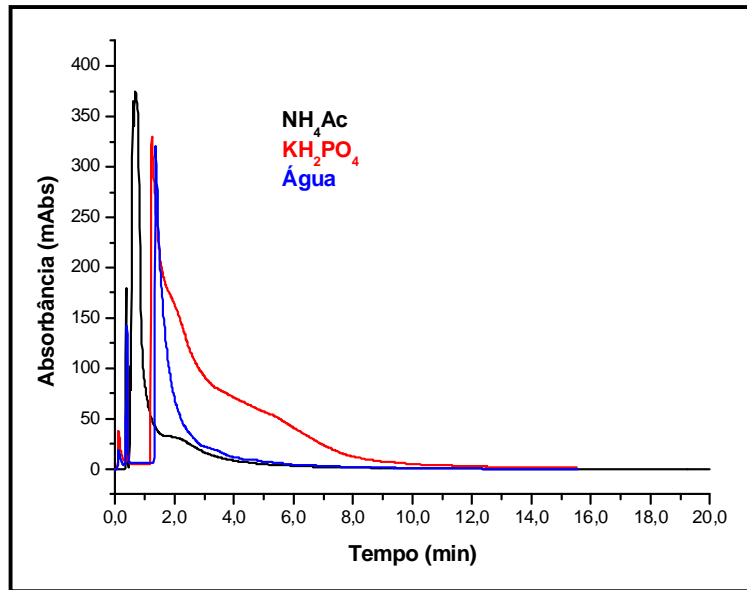
Com a coluna  $C_{18}$  RAM-BSA, embora o perfil de exclusão tenha sido melhor utilizando a solução de fosfato de potássio como fase móvel, o uso da solução de acetato de amônio também levou a um bom perfil de exclusão das macromoléculas. Essa última fase móvel tem a vantagem de ser um sal orgânico podendo ser utilizado no espectrômetro de massas. A **Figura 4.29** mostra o cromatograma comparativo da coluna  $C_{18}$  RAM-BSA para as duas fases móveis avaliadas.



**Figura 4.29** - Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando a coluna C<sub>18</sub>-BSA para as soluções de acetato de amônio e fosfato de potássio (0,01M, pH=6,5). Condições cromatográficas: Vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200  $\mu$ L.

Para avaliar se o baixo desempenho de exclusão apresentado pela coluna RAM-BSA-NH<sub>2</sub> era devido ao uso de soluções de sais orgânicos ou inorgânicos como fases móveis, foi também avaliada uma coluna RAM-BSA em um suporte fenil. Essa coluna vem sendo utilizada com sucesso em nosso grupo de pesquisa para a análise de compostos hidrofílicos em matrizes como plasma e leite. 115, 148

A coluna RAM-BSA fenil não apresentou um bom perfil de exclusão quando do uso de solução fosfato de potássio como fase móvel. Já, o perfil de exclusão obtido utilizando solução acetato de amônio foi semelhante ao perfil com a utilização de água, com eficiente eliminação das macromoléculas das amostras de leite em 5 minutos de análise. A **Figura 4.30** apresenta os perfis de exclusão obtidos para as fases móveis avaliadas.



**Figura 4.30** - Perfil de exclusão para as amostras de leite utilizando a coluna fenil BSA para as soluções acetato e fosfato (0,01M, pH=6,5) e para água. Condições cromatográficas: Vazão: 1,0 mL/min;  $\lambda$ : 280 nm; volume de injeção: 200  $\mu\text{L}$ .

As colunas RAM-BSA preparadas mostraram excelente desempenho na exclusão das macromoléculas do leite, utilizando água como fase móvel. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que a utilização de sais orgânicos ou inorgânicos altera completamente o perfil de exclusão pela coluna RAM-BSA-amino. Deste modo, a aplicação ideal para esta coluna na análise de leite seria para compostos onde a utilização de fases móveis aquosas fosse possível.

De acordo com esse estudo, as colunas RAM-BSA  $\text{C}_{18}$  e fenil apresentaram performance adequada de exclusão para solução acetato de amônio. Já para a solução fosfato de potássio, a coluna RAM-BSA fenil teve o perfil de exclusão das macromoléculas bastante prejudicado.



### **4.1.3 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS PELAS COLUNAS RAM-BSA**

Dentre os compostos citados como objeto de estudo deste trabalho, os cefalosporínicos e o anti-helmíntico albendazol e seus metabólitos já foram amplamente estudados com relação a retenção em colunas RAM-BSA.<sup>57, 115, 122</sup> A retenção dos antibióticos aminoglicosídeos no entanto, não haviam sido estudados em colunas RAM-BSA sendo então selecionados para este estudo.

Por se tratar de cromatografia líquida no modo reverso de eluição deve-se ter em mente que quanto maior a hidrofobicidade de um composto, maior será o seu tempo de retenção. Deste modo, quando um composto ácido ou básico se ioniza, ele se torna mais hidrofílico e, conseqüentemente, seu tempo de retenção é reduzido; assim, quando o pH da fase móvel aumenta, a retenção de um analito ácido diminui e para um analito básico aumenta. Para compostos neutros não ocorre variação do tempo de retenção em função do pH da fase móvel.<sup>92</sup>

Neste trabalho, para a caracterização da retenção dos antibióticos aminoglicosídeos pelas fases RAM, um estudo dos tempos de retenção dos antibióticos em diferentes pHs não é justificado, uma vez que na faixa de trabalho de pH permitido para as colunas com suporte de sílica (pH 3 - 8), os três aminoglicosídeos encontram-se ionizados.

Apesar da excelente exclusão das macromoléculas para as amostras de leite, usando água como fase móvel pelas colunas RAM-BSA, optou-se pela utilização de um tampão orgânico volátil, uma vez que em água haveria uma ionização não controlada dos antibióticos levando a alterações dos tempos de retenção, e também, por se tratar de uma solução sem restrições para o uso em detectores como espectrômetro de massas.

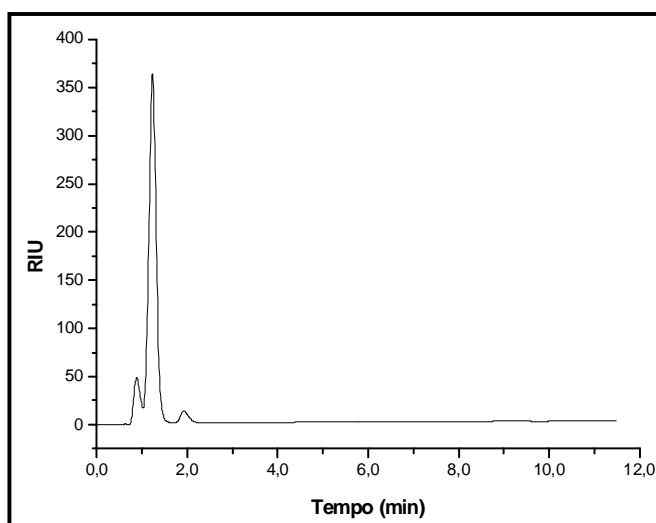
Deste modo, de acordo com os resultados obtidos, a coluna RAM-BSA C<sub>18</sub> e a solução de acetato de amônio (0,01M, pH=6,5 ajustado com HCl 0.1M) foram selecionados para o estudo.

Para esse estudo foi utilizado o detector de índice de refração (RID), uma vez que não havia a necessidade da utilização do espectrômetro de massas, minimizando custos operacionais e tempo de utilização do espectrômetro.

Soluções (50 µg/mL) dos antibióticos neomicina, gentamicina e estreptomicina foram injetadas no sistema cromatográfico separadamente e para cada injeção uma análise de água foi realizada para verificar a deflexão causada pelo índice de refração do solvente de preparo da amostra.

De acordo com os resultados obtidos, para os três antibióticos avaliados, nenhuma banda cromatográfica foi verificada, com exceção da deflexão referente ao índice de refração da água de preparo da amostra.

Acreditando ter usado uma fase móvel muito fraca, a força foi aumentada adicionando-se 2% (v/v) de acetonitrila. A **Figura 4.31** apresenta o cromatograma obtido onde uma banda bastante intensa pode ser observada antes de dois minutos de análise, sugerindo que a fase móvel utilizada era muito forte para os compostos analisados.



**Figura 4.31** – Análise da amostra de neomicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) em solução aquosa utilizando a coluna BSA- $\text{C}_{18}$ . Condições Cromatográficas: Fase Móvel:  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH = 6,5) /  $\text{CH}_3\text{CN}$  (98:02); vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ; Detecção: RID

Tendo aceitado ser esta banda cromatográfica os aminoglicosídeos eluindo no tempo morto da coluna, a formação de um par iônico durante o preparo das amostras foi considerado. A adição de contra-íons à amostra para a formação do par iônico é uma técnica que vem sendo usada com sucesso pelo nosso grupo, para o desenvolvimento de métodos para compostos hidrofílicos.<sup>115, 148</sup>

Foram avaliados o uso de ácido acético (1M) e ácido trifluoracético (0,11 M) de modo que, durante o preparo da amostra, estes eram adicionados em excesso para garantir a formação do par iônico de toda amostra.

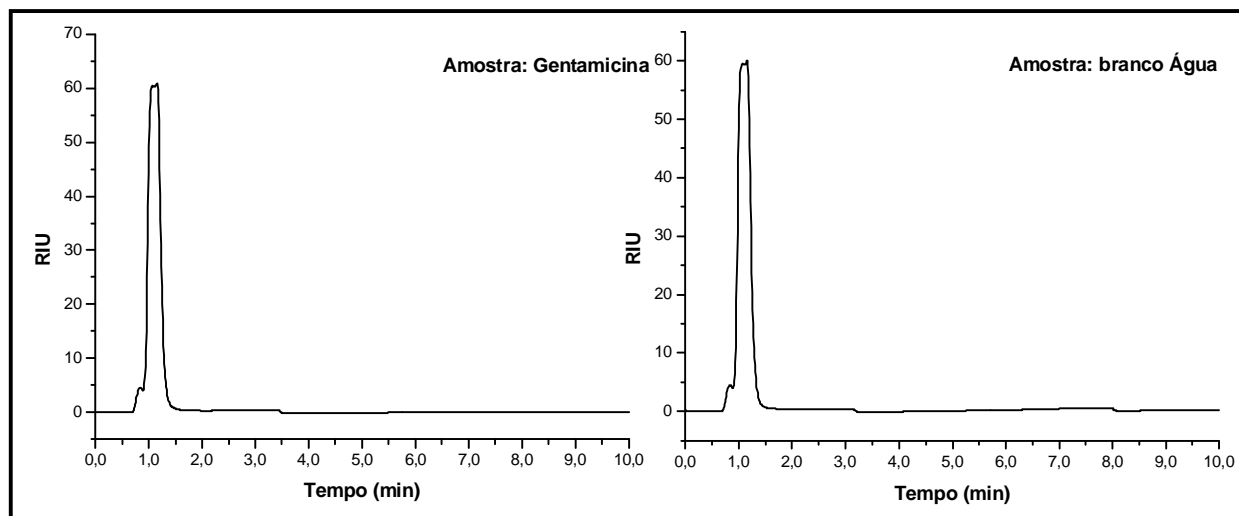
A adição dos ácidos foi avaliada primeiramente utilizando 100% da solução de acetato de amônio (0,01M, pH=6,5 – ajustado com HCl 0,1M) como fase móvel, para a coluna  $\text{C}_{18}$  RAM-BSA. O perfil cromatográfico obtido foi exatamente o mesmo para os 3 antibióticos em estudo com os dois ácidos usados, onde as bandas cromatográficas observadas eram referentes aos contra-íons

utilizados no preparo da amostra, sendo confirmado pela injeção de soluções dos contra-íons nas mesmas condições de análise.

Nenhuma outra banda cromatográfica foi observada, indicando a não eluição ou a não detecção dos analitos de interesse.

A fase móvel contendo 2% de acetonitrila, anteriormente considerada forte para os antibióticos avaliados, foi re-analisada utilizando-se o ácido  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1M) na amostra. De acordo com o cromatograma obtido, a banda cromatográfica observada no tempo morto da coluna era referente a solução do contra-íon utilizado no preparo da amostra, indicando uma possível não eluição dos antibióticos em estudo.

Uma fase móvel mais forte contendo 10% de acetonitrila foi avaliada sem o uso dos ácidos na amostra e, assim como para 2% de acetonitrila, uma banda cromatográfica intensa referente à água utilizada no preparo da amostra foi observada (**Figura 4.32**), indicando uma possível retenção dos antibióticos, ou simplesmente a não detecção pelo detector utilizado.



**Figura 4.32** - Cromatograma de análise da gentamicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando a coluna RAM-BSA  $\text{C}_{18}$ . Condições cromatográficas: FM:  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M,  $\text{pH}=6,5$ )/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10); Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ ; Detecção: RID.

A coluna RAM-BSA- $\text{C}_{18}$  foi então substituída pela coluna RAM-BSA-fenil a qual também foi avaliada com a fase móvel ( $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{CH}_3\text{CN}$ ) (98:02) a fim de verificar a influência da fase estacionária na retenção dos compostos.

Do mesmo modo, a banda cromatográfica observada era referente à água utilizada no preparo da amostra.

Uma alteração do modificador orgânico e conseqüentemente da força da fase móvel utilizada, foi também avaliada com a substituição de acetonitrila por metanol, o qual segundo SNYDER e KIRKLAND<sup>92</sup> tornaria a fase mais fraca.

De acordo com os cromatogramas obtidos, nenhuma alteração foi verificada, sendo a única banda cromatográfica observada referente a água do preparo da amostra.

Assumindo possíveis problemas com o detector e também considerando que a não detecção dos compostos poderia ser causada pela baixa concentração utilizada para as amostras, uma substância de perfil cromatográfico

conhecido, o antibiótico cefalosporínico cefacetril, com boa absorvância no UV foi avaliado para comparação em um estudo de concentração.

Foi verificado que o detector apresentava boa resposta para o cefacetril e também foi verificado que a concentração de 100 µg/mL utilizada no estudo para os antibióticos aminoglicosídeos era muito baixa podendo ser esta a razão para a não detecção dos compostos. No entanto, para os aminoglicosídeos avaliados nenhuma alteração da resposta do detector foi observada para diferentes concentrações analisadas (100, 1000 e 2000 µg/mL).

Para avaliar também a influência da albumina sérica bovina na retenção dos antibióticos, a coluna extratora foi substituída por uma coluna analítica fenil Hypersil (15 x 0,46 cm d.i). Para isto, dois percentuais de acetonitrila em solução de acetato de amônio foram avaliados. Injeções de 100 µL de amostras de 2 mg/mL foram realizadas. Os cromatogramas obtidos foram semelhantes para os três antibióticos avaliados, e apenas uma deflexão referente a água no tempo morto da coluna foi observada.

Considerando que a concentração utilizada para as análises foi suficiente para boa detecção por índice de refração e que o detector não apresentava problemas, foi assumido que fortes interações entre os antibióticos e as fases estacionárias usadas estavam ocorrendo, de modo que não houve eluição dos compostos com as fases móveis avaliadas. Portanto, outras fases móveis mais fortes foram avaliadas para a coluna fenil-BSA. A **Tabela 4.9** apresenta as fases móveis avaliadas.

Apesar da variação da força da fase móvel nenhuma banda cromatográfica foi observada, indicando mais uma vez a alta retenção dos antibióticos pela coluna.

**Tabela 4.9** – Fases móveis avaliadas para a extração dos antibióticos aminoglicosídeos da coluna RAM-BSA fenil.

Composição	% (v/v)
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> CN	90:10
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> CN	85:15
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> OH	80:20
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> CN	25:75
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> OH	20:80

Novamente o uso de agentes de pareamento iônico foi considerado utilizando como fase móvel uma solução de ácido trifluoracético (TFA) (0,01M). A coluna C<sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.) foi utilizada, de modo a tentar reproduzir as condições utilizadas com sucesso por INCHAUSPÉ e colaboradores<sup>33</sup> na separação de uma série de antibióticos aminoglicosídeos.

A **Figura 4.33** mostra os cromatogramas obtidos para os 3 aminoglicosídeos em estudo. Para a estreptomicina e neomicina, foi possível observar bandas cromatográficas diferentes do observado para a água; já para a gentamicina várias bandas podem ser observadas, indicando a separação entre os componentes da gentamicina.

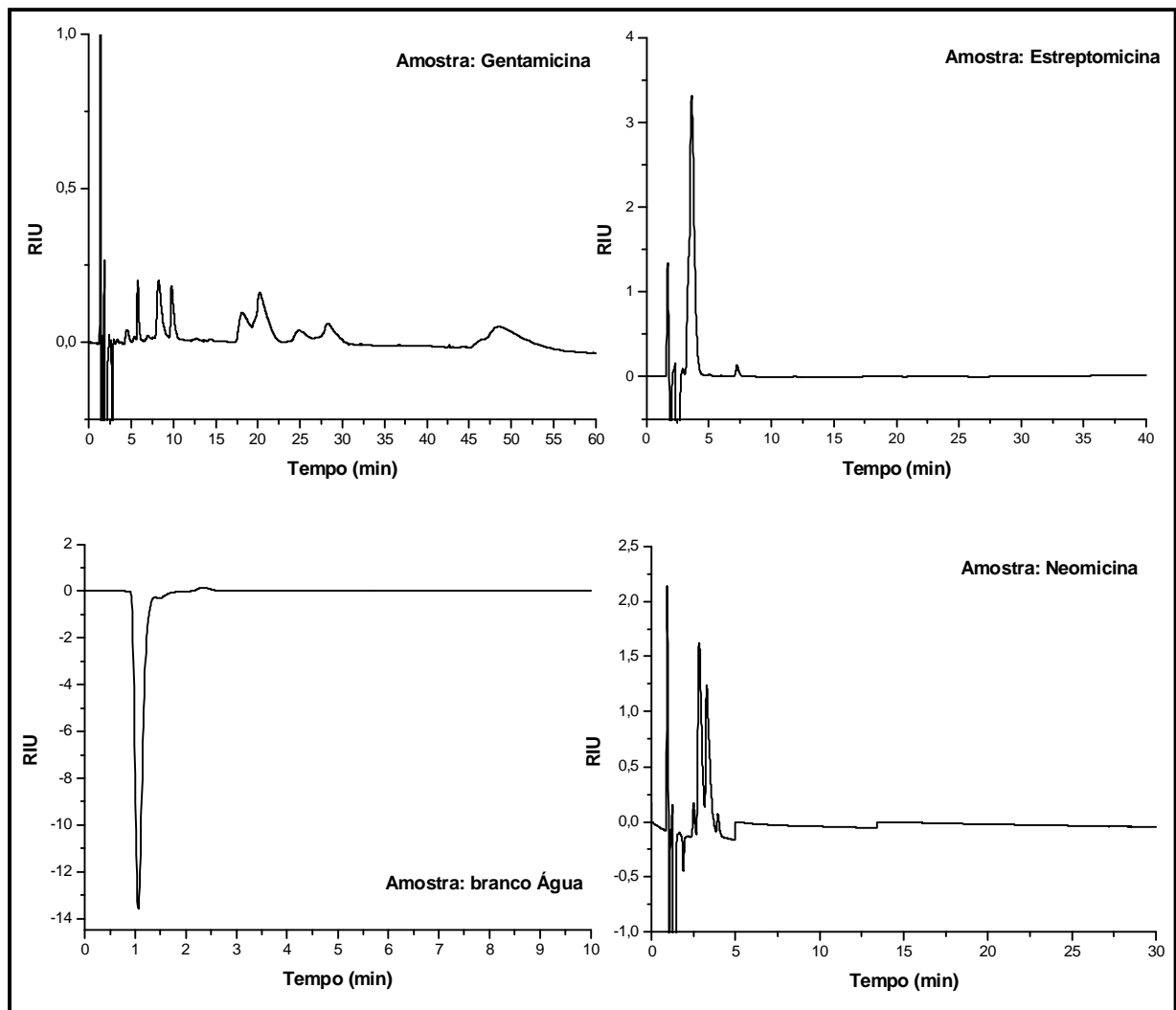
Uma eficiente separação para os constituintes da gentamicina foi obtida por CLAROT e colaboradores<sup>34</sup> com a utilização de uma fase móvel de TFA 48,5 mM e metanol (97:03) empregando o detector de espalhamento de luz (ELSD). Com base neste estudo, foram avaliadas as fases móveis TFA (48,5mM)/CH<sub>3</sub>OH nas proporções 97:03 e 99:01.

Com exceção da estreptomicina os outros dois antibióticos apresentaram bandas distintas do índice de refração observado para a água. A **Figura 4.34** mostra os cromatogramas obtidos para a gentamicina nas duas

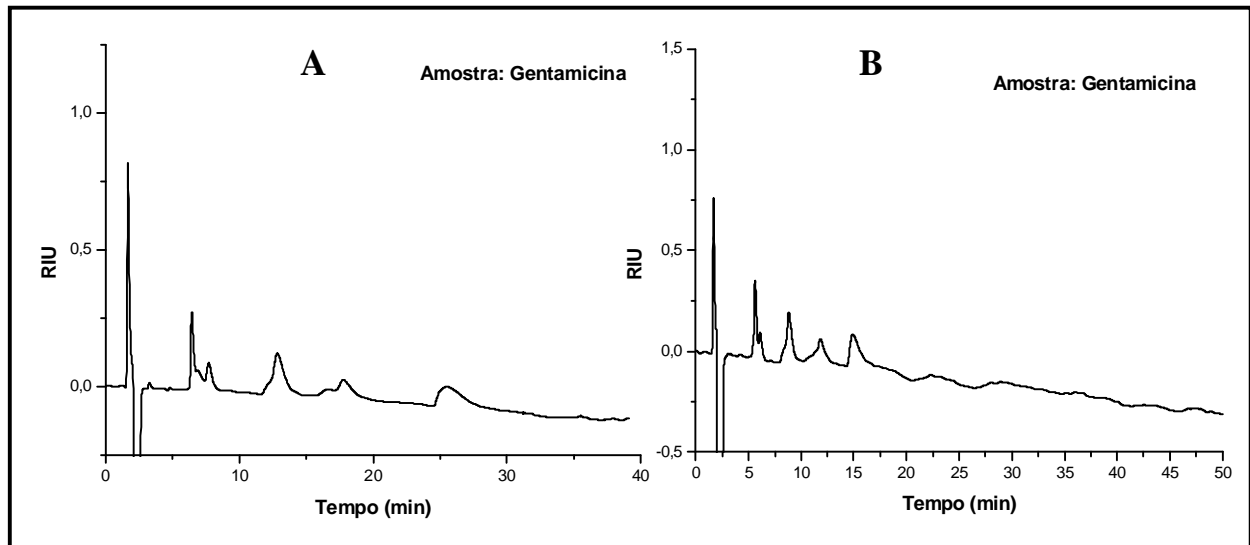
proporções da fase móvel, onde é possível observar que, com o aumento da porcentagem do modificador orgânico a retenção dos antibióticos diminuiu.

Uma vez que foi possível a separação dos componentes do antibiótico gentamicina utilizando-se a coluna C<sub>18</sub> analítica e TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (99:01) como fase móvel, a mesma fase móvel foi avaliada para a coluna C<sub>18</sub> RAM-BSA. Os cromatogramas obtidos foram semelhantes para os três antibióticos avaliados, onde a banda cromatográfica observada era referente ao índice de refração da água, solvente de preparo da amostra.





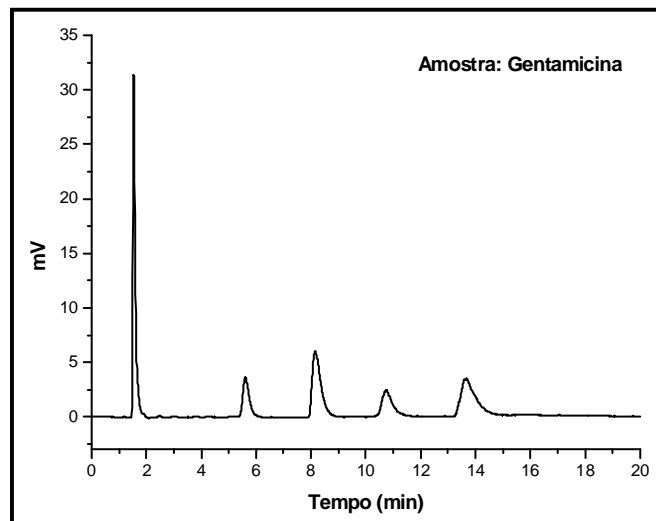
**Figura 4.33** - Cromatogramas de análise dos antibióticos aminoglicosídeos (2 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: FM: TFA (0,1M, pH=1,2); Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 50 µL, Detecção: RID.



**Figura 4.34** - Cromatogramas de análise da gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub> Hypersil (15 x 0.46 cm d.i.). Condições cromatográficas: FM: **A**-TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (99:01), **B**- TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (97:03), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 50 µL, Detecção: RID.

A utilização do índice de refração como detector para os antibióticos em estudo não foi satisfatória, uma vez que os cromatogramas obtidos ofereceram dúvidas com relação à existência ou não de bandas cromatográficas, devido à sua baixa sensibilidade para os analitos e alta instabilidade. O detector de espalhamento de luz, não seletivo, universal como o índice de refração, foi então utilizado para dar continuidade às avaliações de retenção dos antibióticos aminoglicosídeos nas colunas RAM-BSA.

Um primeiro teste foi realizado repetindo as condições experimentais descritas por CLAROT<sup>34</sup> de modo a verificar se as condições otimizadas para o detector estavam boas para a análise dos antibióticos. A **Figura 4.35** mostra o cromatograma obtido, onde é possível identificar de acordo com o artigo a gentamicina C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>1</sub>.



**Figura 4.35** - Cromatograma de análise da gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.). Condições cromatográficas: FM: TFA (48,5 mM, pH=1,5)/MEOH (97:03), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 50 µL Condições do detector de espalhamento de luz: Vazão do gás: 1,6 L/min; Temperatura: 70°C

Confirmada a boa performance do detector, as mesmas condições foram aplicadas utilizando a coluna RAM-BSA-C<sub>18</sub> para os 3 antibióticos em estudo. Assim como os resultados anteriores, os cromatogramas obtidos apresentaram bandas cromatográficas eluindo no tempo morto da coluna.

Várias proporções de fase móvel foram novamente avaliadas (**Tabela 4.10**), e de acordo com os resultados obtidos, as colunas RAM-BSA apresentaram uma alta retenção dos analitos de interesse com a utilização de solução acetato de amônio (0,01M, pH=6,5) independente da porcentagem de modificador orgânico utilizado e uma baixa retenção com a utilização de ácido trifluoacético (TFA) 48,5 mM.

**Tabela 4.10** - Fases móveis avaliadas utilizando as colunas RAM-BSA C<sub>18</sub> e fenil para os antibióticos aminoglicosídeos e detecção por ELSD.

Composição	% (v/v)
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)	100
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/TFA (48,5 mM)	99:01
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/TFA (48,5 mM)	97:03
NH <sub>4</sub> Ac (0,01M, pH=6,5)/CH <sub>3</sub> OH/TFA (48,5 mM)	95:04:01
TFA (48,5 mM)CH <sub>3</sub> OH	99:01
TFA (48,5 mM)CH <sub>3</sub> OH	97:03

Foi considerado então, o uso de duas fases móveis; uma primeira para excluir com eficiência as macromoléculas e reter os aminoglicosídeos de interesse e uma segunda fase móvel para extrair-los da coluna RAM-BSA para posterior análise.

Apesar dos bons resultados obtidos para a exclusão das macromoléculas do leite pelas colunas RAM-BSA utilizando a solução acetato de amônio como fase móvel, a fase móvel NH<sub>4</sub>Ac/CH<sub>3</sub>OH (97:03), que embora não tenha sido avaliada quanto ao poder de exclusão das proteínas, foi selecionada como fase de exclusão com base nos estudos realizados por YU e WESTERLUND<sup>98</sup>.

Segundo os autores a presença de pequenas quantidades de modificador orgânico na fase móvel auxiliou a exclusão protéica, além de proporcionar um aumento na recuperação dos compostos, redução da adsorção de lipídeos e compostos endógenos sob a superfície do suporte e estreitamento da banda cromatográfica dos analitos de interesse.

Deste modo, a fase móvel  $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{CH}_3\text{OH}$  (97:03) foi utilizada para a exclusão das macromoléculas do leite e diferentes proporções de TFA foram avaliadas como fases de extração dos antibióticos.

As fase móveis testadas foram:

**Linha A:**  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/  $\text{CH}_3\text{OH}$  (97:03)

**Linha B:**

$\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/  $\text{CH}_3\text{OH}$  /TFA (48,5mM) (95:03:02)

$\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/TFA (48,5mM) (96:04)

$\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/TFA (48,5mM) (97:03)

$\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/TFA (48,5mM) (90:10)

TFA (0,01 M)/  $\text{CH}_3\text{OH}$  (97:03)

TFA (0,005 M)/  $\text{CH}_3\text{OH}$  (95:05)

Foi também realizada a mudança do modificador orgânico de metanol para acetonitrila na fase de exclusão e nenhuma alteração significativa foi observada; todos os resultados apresentaram bandas cromatográficas eluindo no tempo morto da coluna.

Devido à alta hidrofiliabilidade e polaridade dos analitos avaliados, o tamanho da coluna BSA utilizada (5 cm) poderia estar sendo um fator limitante para a eficiente retenção dos antibióticos aminoglicosídeos avaliados. Deste modo, uma coluna  $\text{C}_{18}$  – BSA de 10 cm de comprimento foi selecionada para dar continuidade ao estudo.

A concentração de TFA foi alterada para 0,02M para garantir eficiente formação de par iônico na amostra e várias proporções de fase móvel utilizando TFA 0,02M,  $\text{NH}_4\text{Ac}$  0,01M,  $\text{CH}_3\text{CN}$  e  $\text{CH}_3\text{OH}$  foram avaliadas. Apesar das variações de força da fase móvel, os tempos de retenção obtidos para os três aminoglicosídeos estudados foram menores que 5 minutos de análise.

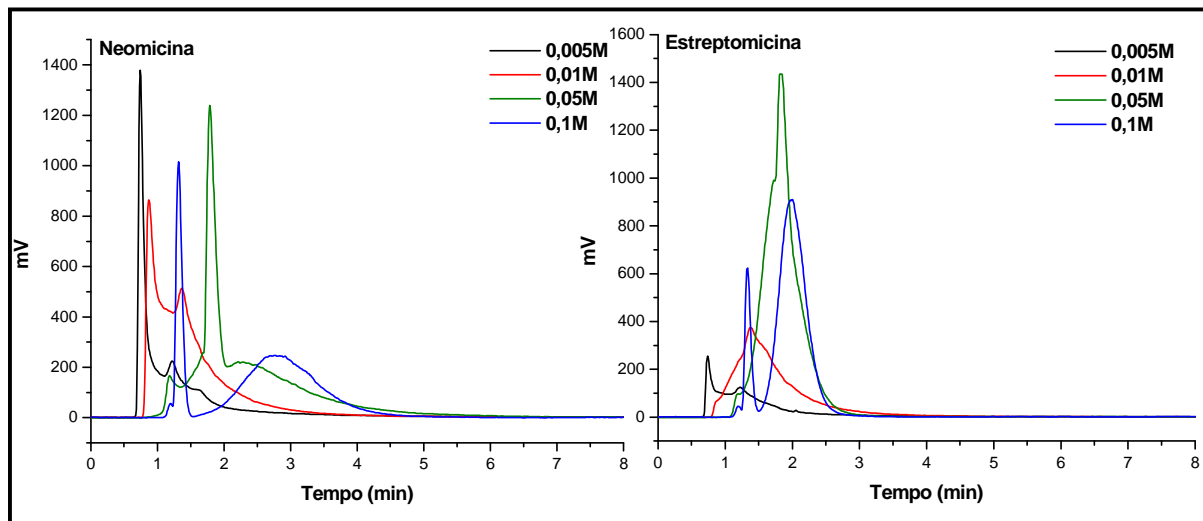
Uma vez que nenhuma fase móvel avaliada foi adequada para as análises dos aminoglicosídeos utilizando as colunas RAM-BSA e baseando-se no estudo realizado por INCHAUSPÉ e colaboradores <sup>33</sup>, uma avaliação do fator de retenção (k) para os antibióticos estudados utilizando a coluna RAM-BSA C<sub>18</sub> para diferentes concentrações de TFA foi realizado.

Foram avaliadas as concentrações 0,005, 0,01, 0,05 e 0,1M de TFA, as quais apresentaram um valor de pH entre 2,6 e 1,3, que embora seja um fator limitante nas análises, uma vez que a sílica utilizada no preparo das colunas BSA suportam uma faixa de pH entre 2 e 8, poderia apresentar eficiente extração dos antibióticos estudados. Uma comparação com a coluna analítica C<sub>18</sub> (Hypersil, 10 µm, 120 Å, 15 x 0,46 cm d.i.) foi também realizada para verificar a influência da albumina na retenção dos antibióticos em diferentes concentrações de TFA.

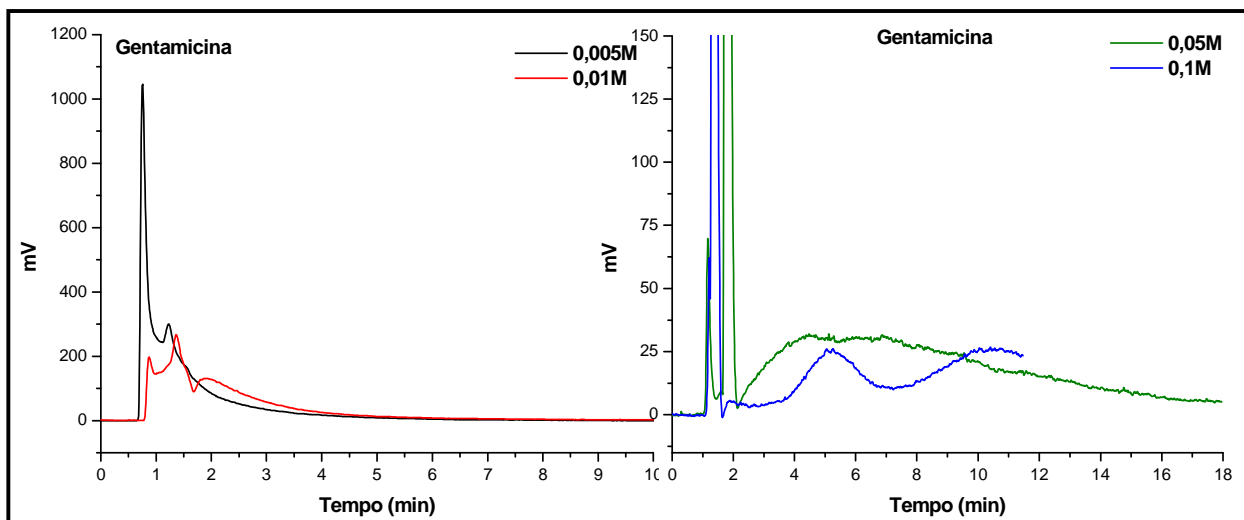
As soluções padrões foram preparadas em solução de TFA 0,05M, na concentração de 1,0 mg/mL para que não houvessem dúvidas com relação à resposta do detector de espalhamento de luz utilizado.

Os parâmetros do detector foram otimizados para a fase aquosa de 100% de TFA, onde a temperatura do tubo foi de 115 °C, a vazão de gás (ar comprimido) 3,2 L/min, o ganho 1 e impactor off, de modo que uma eficiente resposta fosse obtida.

Mudanças de retenção foram poucos significantes para as amostras de neomicina e estreptomicina quando a coluna RAM-BSA C<sub>18</sub> foi avaliada usando TFA como fase móvel em diferentes concentrações. Entretanto, para as amostras de gentamicina foi notado alterações de retenção nas concentrações mais altas de TFA. As **Figuras 4.36 e 4.37** mostram os cromatogramas obtidos.



**Figura 4.36** – Cromatogramas de análise da Neomicina e Estreptomicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-BSA (Hypersil 10x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01, 0,05 e 0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.



**Figura 4.37** – Cromatogramas de análise da Gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-BSA (Hypersil 10x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01, 0,05 e 0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

Pode-se observar, apesar do ruído da linha de base, um início de separação dos componentes da gentamicina com a variação da concentração de TFA de 0,05 M para a 0,1 M. De acordo com essa separação, é possível inferir que um aumento da concentração do agente pareante leve a maiores tempos de retenção e separações entre os componentes da gentamicina.

No entanto, concentrações maiores resultarão em valores de pH menores que 1,0 tornando inviável sua aplicação, uma vez que o suporte de sílica utilizado para a coluna RAM-BSA não suporta tais valores de pH. Este pH também poderia ser prejudicial à exclusão das macromoléculas do leite, uma vez que de acordo com um estudo já realizado no grupo a exclusão de proteínas do leite é prejudicada em valores baixos de pH.<sup>115</sup>

Para a coluna analítica C<sub>18</sub>, os resultados obtidos para os antibióticos neomicina e estreptomicina mostraram alterações pouco significativas nos fatores de retenção de acordo com o aumento da concentração de TFA. Os cromatogramas apresentaram bandas cromatográficas com tempos de retenção menores que cinco minutos de análise. No entanto, os resultados obtidos para a gentamicina confirmaram a seletividade do ácido trifluoracético, uma vez que os fatores de retenção aumentaram de acordo com o aumento da concentração do ácido.

Foi possível observar em todas as concentrações avaliadas, quatro bandas cromatográficas referentes às gentamicinas C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>1</sub>. A separação entre elas aumentou, de acordo com o acréscimo da concentração de TFA. Deste modo, com o intuito de obter condições cromatográficas eficientes para o controle de qualidade de medicamentos veterinários, foi também realizado um estudo mais detalhado envolvendo outros agentes de pareamento iônico (**Item 4.2**).

De acordo com os resultados obtidos para o estudo de avaliação da capacidade de retenção dos antibióticos aminoglicosídeos pelas colunas RAM-BSA, pode-se concluir que a utilização destas colunas é problemática uma vez que



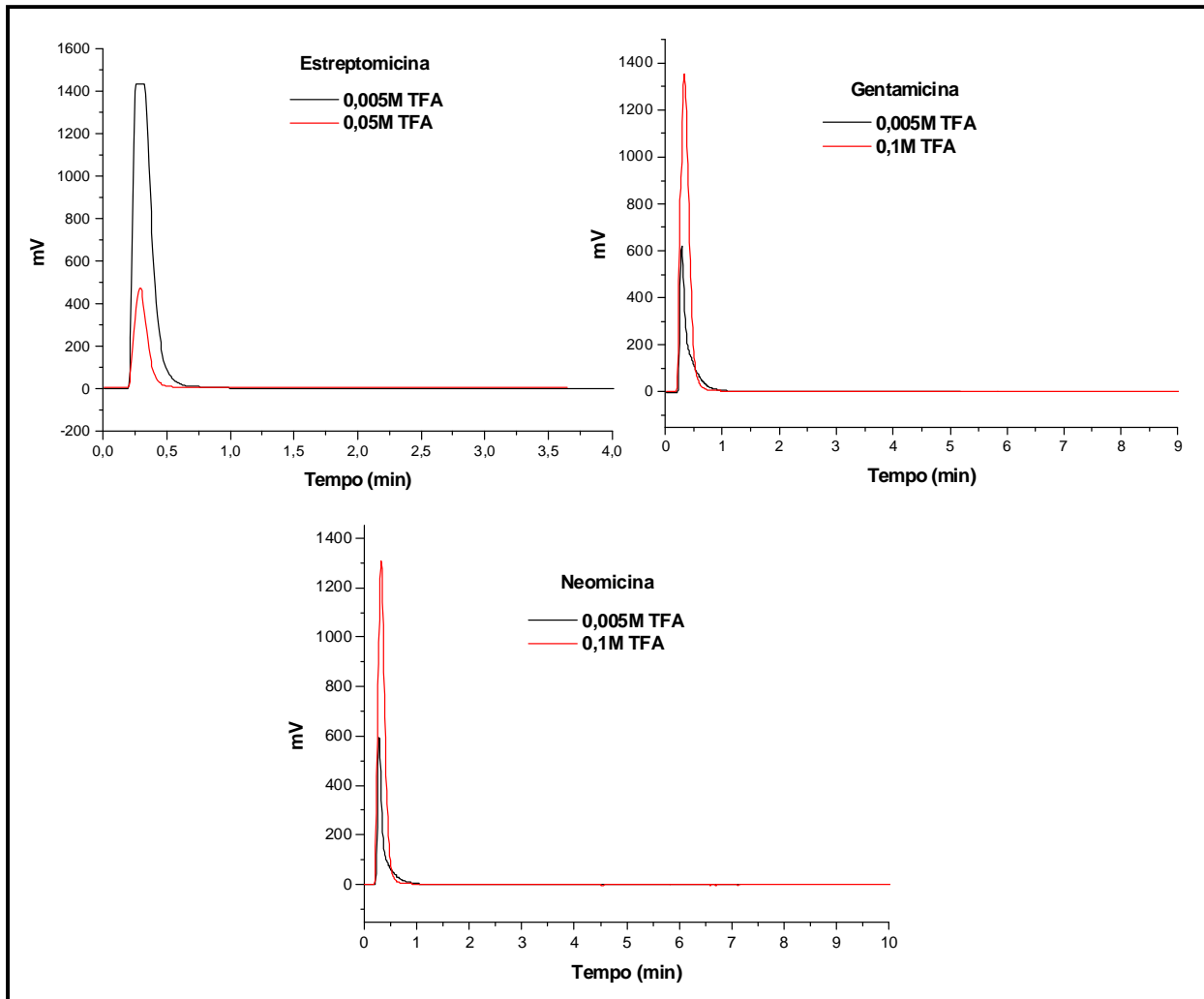
o comportamento apresentado por estes antibióticos nessas colunas é diferente e imprevisível. Isso pôde ser percebido pelas análises realizadas, onde as várias fases móveis com diferentes forças e composições avaliadas apresentaram retenções muito altas e outras vezes retenções muito baixas, comprometendo assim o desenvolvimento de métodos para análise direta destes compostos.

Uma vez que a análise dos antibióticos aminoglicosídeos utilizando as colunas RAM-BSA não apresentou resultados satisfatórios, foi também avaliada uma coluna RAM RP C<sub>18</sub> ADS (2,5 x 0,40 cm d.i.; 25 µm, 60 Å, Merck) para verificar a influência do recobrimento da coluna RAM na retenção destes antibióticos.

#### **4.1.4 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO A COLUNA DE FASE DE ACESSO RESTRITO ADS E TFA COMO AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO COM DETECÇÃO POR ELSD**

As fases chamadas ADS (Alkyl-Diol Silica) apresentam uma superfície externa com características hidrofílicas contendo grupos diol e superfície interna com características hidrofóbicas devido à presença de grupos alquílicos (butil, octil ou octadecil) ligados à sílica.

As condições cromatográficas utilizando diferentes concentrações de TFA como fase móvel, avaliadas para as colunas RAM-BSA, foram utilizadas para a coluna ADS e os resultados obtidos foram semelhantes para os três antibióticos em estudo, onde foi observada uma intensa banda cromatográfica com menos de um minuto de análise (**Figura 4.38**).



**Figura 4.38** – Cromatogramas de análise das amostras de estreptomicina, gentamicina e neomicina (1,0 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-ADS (2,5 x 0,40 cm d.i.; 25  $\mu$ m, 60  $\text{\AA}$ ). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005 e 0,1 M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15  $\mu$ L. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 103,4  $^{\circ}$ C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

Foi feita então, variação na força da fase móvel por adição de metanol, em diferentes proporções:

- TFA (0,005M)/MeOH (97:03)
- TFA (0,01M)/MeOH (90:10)

- TFA (0,05M)/MeOH (70:30)

- TFA (0,1M)/MeOH (85:15)

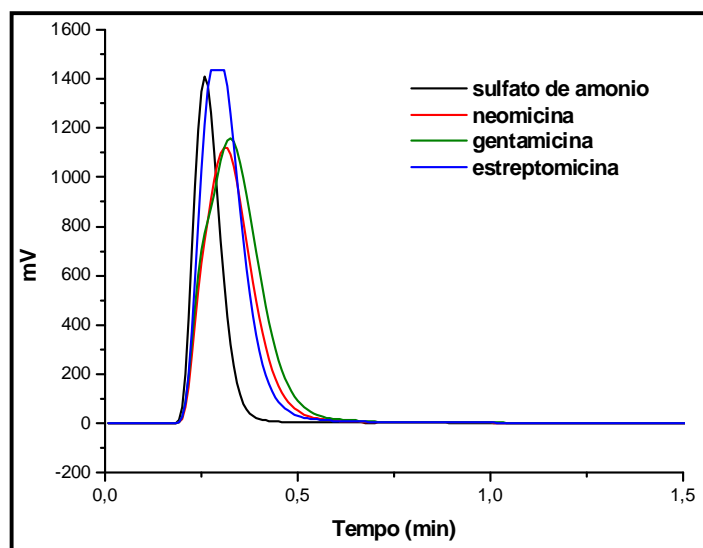
Embora uma considerável alteração na força da fase móvel tenha sido realizada nenhuma outra banda cromatográfica foi observada.

Uma vez que os padrões utilizados para as análises são descritos como sais de sulfato dos respectivos antibióticos, uma solução de sulfato de amônio foi preparada e analisada para verificar se as bandas cromatográficas observadas eram referentes aos compostos de interesse ou ao contra-íon sulfato.

A **Figura 4.39** mostra os resultados obtidos, onde pode-se verificar que o sulfato resulta em uma intensa banda cromatográfica com menos de um minuto de análise. No entanto, a sobreposição dos cromatogramas das amostras e do sulfato mostra que as bandas cromatográficas apresentadas pelos antibióticos são mais largas e com a presença de um “ombro” indicando co-eluição com o sulfato.

Deste modo, assim como para as colunas recobertas com albumina sérica bovina, a coluna C<sub>18</sub> ADS apresentou baixa retenção para os três aminoglicosídeos avaliados, tornando inviável a utilização da mesma para essas análises.

Uma vez que nenhuma das condições cromatográficas avaliadas foi eficiente, para a retenção adequada dos antibióticos aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina e estreptomicina) não foi possível o desenvolvimento de um método direto de análise utilizando as colunas de fase de acesso restrito C<sub>18</sub> – BSA e – ADS



**Figura 4.39** – Cromatogramas de análise das amostras de neomicina, gentamicina, estreptomicina e do sulfato de amônio (1,0 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub>-ADS (2,5 x 0,40 cm d.i.; 25 µm, 60 Å). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 103,4 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

#### 4.2 – AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO (K) PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE PAREAMENTO IÔNICO E DETECÇÃO POR ELSD

As cromatografias de par iônico e no modo reverso possuem várias propriedades em comum, as fases estacionárias e móveis são as mesmas diferindo principalmente na adição do contra-íon na fase móvel para a cromatografia de pareamento iônico.

Neste tipo de cromatografia, o pH da fase móvel é ajustado de modo que os compostos de interesse estejam na sua forma ionizada sendo a retenção controlada pela adição de um contra-íon de carga oposta na fase móvel. Deste

modo, a retenção nesta cromatografia é dependente da concentração e da hidrofobicidade (cadeia alquílica) dos agentes de pareamento iônico, uma vez que o agente pareante se encontra em um equilíbrio dinâmico entre a fase móvel e a fase estacionária hidrofóbica da coluna.<sup>149</sup>

Apesar dos mecanismos de retenção para cromatografia de pareamento iônico não serem completamente compreendidos, duas teorias são propostas:<sup>92, 149-152</sup> formação do par iônico e troca iônica dinâmica.

No primeiro modelo, o analito e o contra-íon formam o par iônico na fase móvel e a separação ocorre pela distribuição do par entre as fases estacionária e móvel (**Figura 4.40A**). A retenção pode ser controlada variando a concentração do modificador orgânico na fase móvel, como no modo reverso clássico.

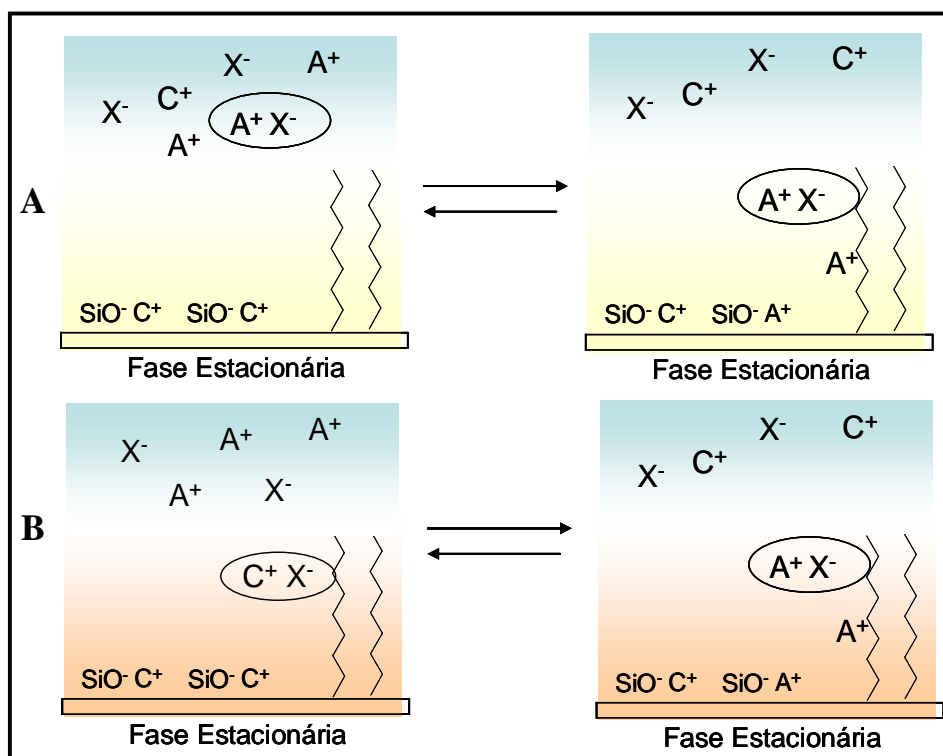
O segundo modelo assume que a porção hidrofóbica do contra-íon adsorve na fase estacionária e o par iônico é feito por uma interação dinâmica do soluto com a monocamada do contra-íon adsorvido (**Figura 4.40B**). Os solventes da fase móvel podem ser usados para impedir a interação do contra-íon com a fase estacionária, alterando deste modo a capacidade da coluna em adsorver o contra-íon.

Ambos os mecanismos de retenção propostos são possíveis e a expressão matemática para a relação fator de retenção  $k$  e concentração do contra-íon é a mesma nos dois modelos.

O mecanismo de retenção dos analitos pode ser continuamente alternado de modo reverso à troca iônica (par iônico) de acordo com a quantidade de contra-íon adsorvido na fase estacionária; e isto é afetado variando a concentração do contra-íon na fase móvel.<sup>92</sup>

Para ambos modelos de mecanismo de retenção, o aumento da concentração do agente de pareamento iônico leva a um aumento do  $k$  (fator de retenção).

Do mesmo modo, a adsorção dos agentes de pareamento iônico na fase estacionária aumenta até um valor onde ocorre o saturamento da coluna cromatográfica de modo que a adsorção tende a diminuir mesmo com o aumento da concentração do contra-íon. Uma vez que o mecanismo envolvido é o de troca iônica, o aumento da concentração do agente de pareamento conseqüentemente leva a um aumento na concentração do respectivo contra-íon no meio, o qual compete com a formação do par iônico na superfície da coluna cromatográfica influenciando o mecanismo de retenção.<sup>92, 149, 150</sup>



**Figura 4.40** – Interações entre o soluto catiônico  $A^+$  e a fase estacionária de sílica de acordo com os mecanismos: (A) formação do par iônico na fase móvel e (B) troca iônica dinâmica na fase estacionária, na presença do aditivo  $X^- C^+$  na fase móvel.

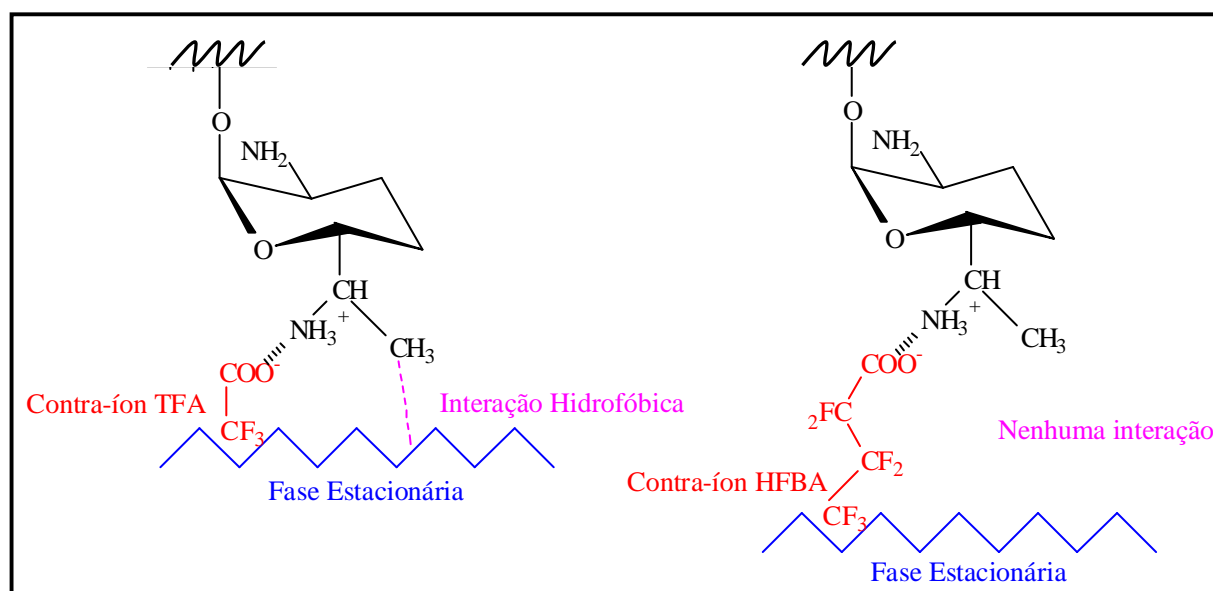
De acordo com a natureza do agente de pareamento iônico, concentrações diferentes resultam em um mesmo  $k$  para um determinado analito; uma vez que agentes hidrofóbicos saturam a fase estacionária, em cromatografia de fase reversa, em uma concentração menor do que os agentes mais hidrofílicos.<sup>92</sup> Deste modo, a concentração do agente de pareamento iônico é de fundamental importância para uma eficiente separação cromatográfica.

A cromatografia de pareamento iônico é o método cromatográfico mais utilizado na análise de aminoglicosídeos, devido às características polar, iônica e básica apresentada por estes compostos. Os contra-íons mais utilizados são carregados negativamente como, por exemplo, pentano, hexano e heptano sulfonatos. Entretanto, alquilsulfonatos não podem ser usados em aplicações de LC-MS devido as suas características não-voláteis podendo ser substituídos por ácidos carboxílicos perfluorados voláteis<sup>14</sup>, os quais têm sido utilizados com sucesso nas análises de cromatografia preparativa.<sup>33</sup>

As aplicabilidades dos diferentes contra-íons perfluorados, para a análise de aminoglicosídeos, têm sido comparadas e o mecanismo de separação também tem sido investigado. INCHAUSPÉ e SAMAIN<sup>33</sup> analisaram os antibióticos aminoglicosídeos usando como eluentes os agentes de pareamento iônico, ácido pentafluorpropiónico (PFPA), ácido heptafluorbutírico (HFBA) e TFA. Apesar das pequenas cadeias carbônicas, os ácidos PFPA e HFBA podem ser utilizados com eficiência como contra-íons para os antibióticos neomicina e estreptomicina; entretanto, para a gentamicina foi obtida uma baixa separação cromatográfica. O TFA, por outro lado, mostrou-se especialmente seletivo para a gentamicina, com adequada resolução cromatográfica entre os constituintes da gentamicina.<sup>33, 153</sup>

A habilidade do TFA, para a retenção seletiva da gentamicina, pode ser explicada pela pequena distância do grupo metil (na posição  $\alpha$  em relação ao

grupo amina) com a fase estacionária, o que permite a interação simultânea do grupo amina com o contra-íon, e do grupo metil com a fase hidrofóbica da coluna (Figura 4.41).<sup>33</sup>



**Figura 4.41** – Mecanismo de retenção para a gentamicina usando ácidos fluorinados como agente de pareamento iônico.

Baseado nos resultados obtidos com a avaliação da capacidade de retenção dos antibióticos amionoglicosídeos utilizando as colunas RAM-BSA, foi realizado um estudo do fator de retenção destes compostos utilizando concentrações diferentes de três agentes de pareamento perfluorados (TFA, PFPA e HFBA) e duas colunas analíticas (C<sub>18</sub> e fenil Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.)). O conhecimento do comportamento cromatográfico destes compostos na cromatografia de pareamento iônico é essencial para o desenvolvimento de novos métodos de análise.



#### 4.2.1 – AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO O AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO TFA NAS COLUNAS C<sub>18</sub> E FENIL

Para o estudo do fator de retenção utilizando como agente de pareamento iônico o ácido TFA, foram avaliadas as concentrações 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1 M. As soluções padrões foram preparadas em TFA 0,05M na concentração de 1,0 mg/mL.

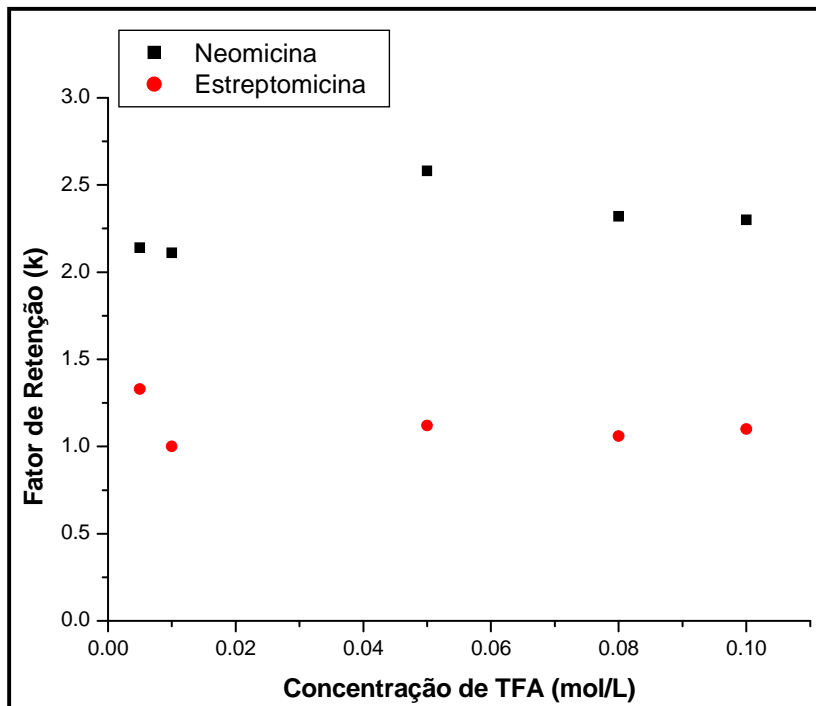
Os parâmetros do detector foram otimizados para a fase aquosa de 100% de TFA, onde a temperatura do tubo foi de 115 °C, a vazão de gás (ar comprimido) 3,2 L/min, o ganho 1 e impactor off, de modo que uma eficiente resposta fosse obtida.

De acordo com os resultados obtidos, os antibióticos neomicina e estreptomicina apresentaram fatores de retenção baixos utilizando a coluna analítica C<sub>18</sub>, mostrando a baixa afinidade dos pares iônicos formados pela fase estacionária. Nenhuma alteração significativa nos fatores de retenção foi verificada para ambos compostos com o aumento da concentração do ácido. A **Figura 4.42** apresenta os resultados obtidos.

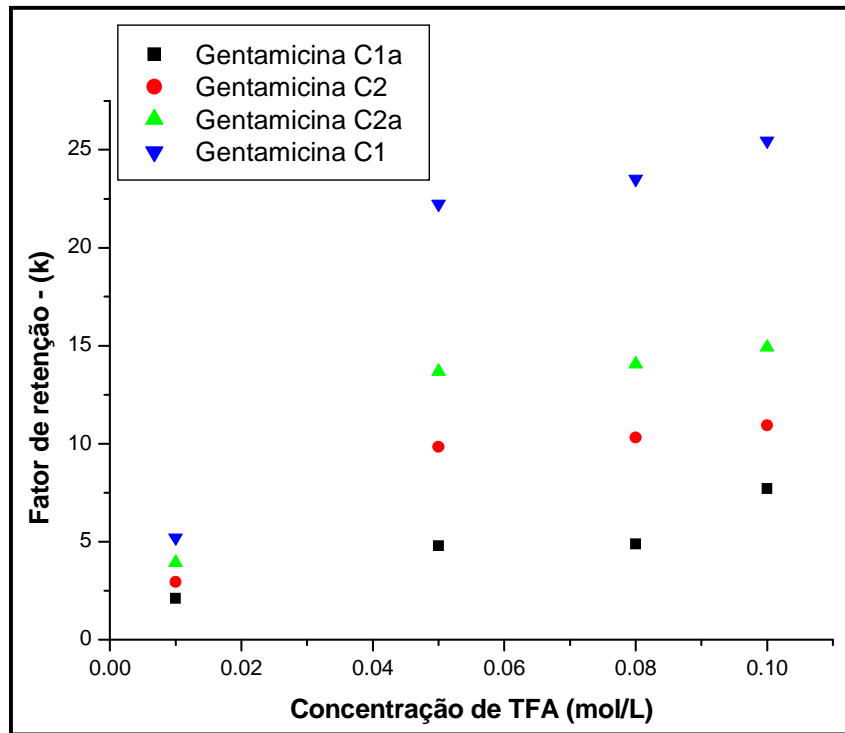
Os resultados obtidos para a gentamicina confirmaram a seletividade do ácido trifluoracético, uma vez que os fatores de retenção aumentaram de acordo com o aumento da concentração do ácido.

Aqui também foi possível observar, em todas as concentrações avaliadas, as quatro bandas cromatográficas referentes as gentamicinas C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>1</sub> e a seletividade entre elas foi aumentada de acordo com o acréscimo na concentração de TFA. A **Figura 4.43** mostra o aumento do k de acordo com as concentrações avaliadas para as quatro gentamicinas observadas e a **Figura 4.44**

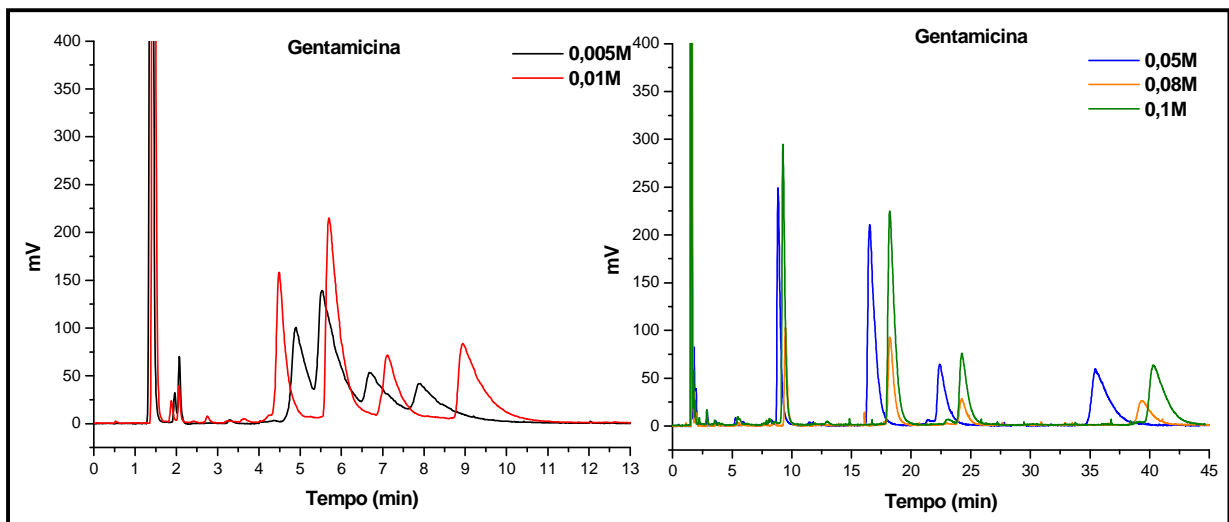
apresenta os cromatogramas obtidos, onde pode-se observar separação entre as gentamicinas a partir da concentração 0,05M.



**Figura 4.42** - Influência da concentração de TFA no fator de retenção (k) dos antibióticos neomicina e estreptomicina.



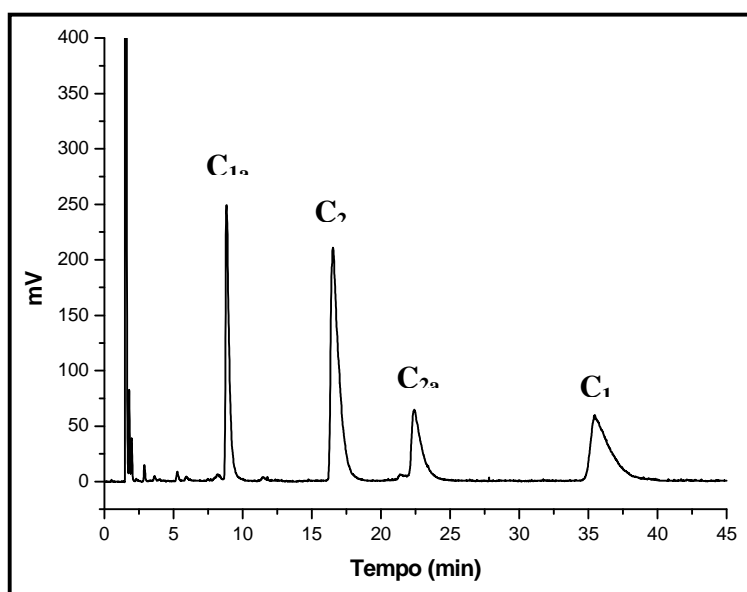
**Figura 4.43** – Influência da concentração de TFA no fator de retenção (k) do antibiótico gentamicina.



**Figura 4.44** – Cromatogramas de análise da Gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna  $C_{18}$  (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01, 0,05, 0,08 e 0,1M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

Excelente resolução foi obtida entre todas as bandas cromatográficas de gentamicina, quando TFA foi usado na concentração de 0,05 M (**Figura 4.45**). Deste modo, essa concentração pode ser utilizada quando da otimização de condições de separação em menor tempo de análise.

Para verificar a influência da fase estacionária na retenção dos compostos analisados, a coluna fenil foi então avaliada nas mesmas condições da coluna C<sub>18</sub>. Em cromatografia no modo reverso, as interações predominantes na coluna fenil, assim como na C<sub>18</sub>, são interações hidrofóbicas. No entanto, interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , predominantes nesta coluna no modo normal de eluição, podem também ocorrer.



**Figura 4.45** – Cromatograma de análise da Gentamicina (1 mg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub> (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA 0,05M, Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

De acordo com os resultados obtidos, uma diminuição nos fatores de retenção para os três antibióticos aminoglicosídeos avaliados foi verificado com o

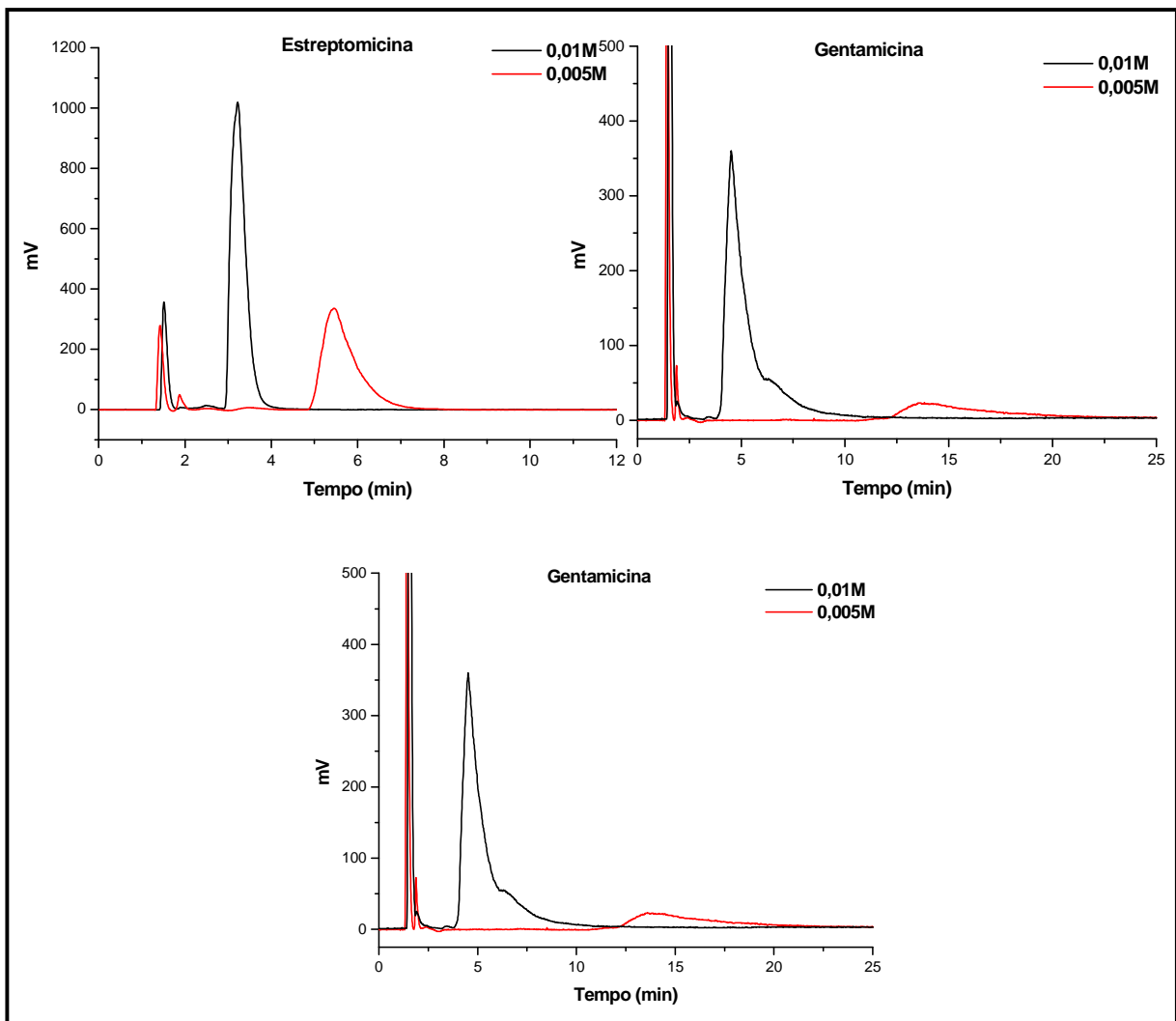
aumento da concentração de 0,005M para 0,01M de TFA. A partir desta concentração, nenhuma alteração significativa nos fatores de retenção foi verificada assim como nenhuma resolução para as gentamicinas foi observado. A **Figura 4.46** mostra os cromatogramas obtidos para os três antibióticos nas concentrações 0,005 e 0,01M.

Esses resultados mostram que somente um dos mecanismos propostos para a cromatografia de par iônico deve estar ocorrendo, ou seja, a formação do par iônico na fase móvel, e não troca iônica dinâmica pela adsorção do contra-íon na fase estacionária, uma vez que neste último caso, um aumento no tempo de retenção seria esperado.

A comparação entre as colunas fenil e C<sub>18</sub> para as concentrações 0,005 e 0,01M (**Figura 4.47**) mostra a grande diferença obtida para a concentração 0,005M e a semelhança entre as bandas cromatográficas na concentração 0,01M, indicando que o mecanismo de retenção é diferente para as duas colunas.

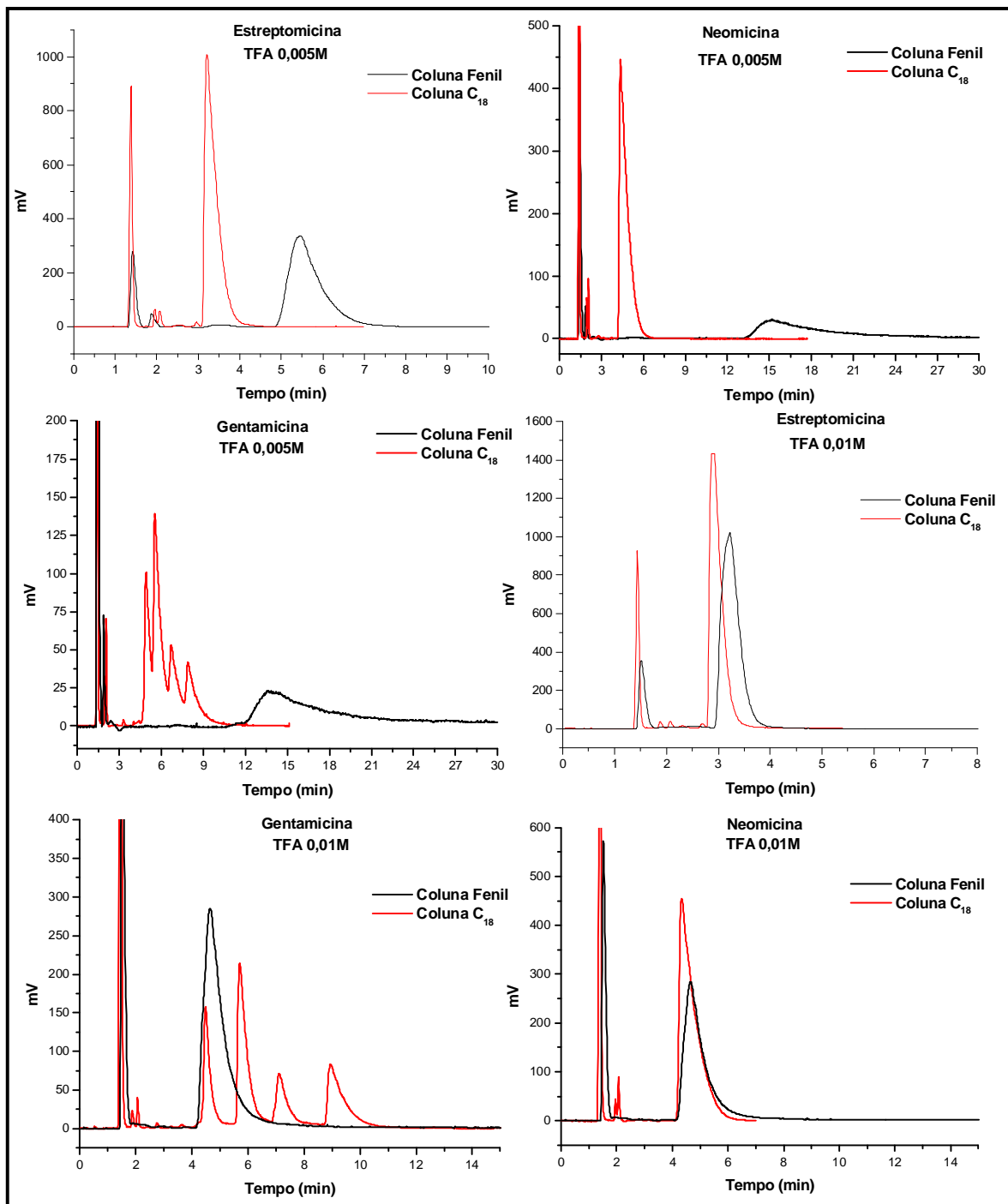
Na coluna C<sub>18</sub> provavelmente o mecanismo é o da troca iônica dinâmica pela adsorção do contra-íon na fase estacionária, onde o aumento da concentração do agente de pareamento iônico leva a uma maior adsorção do mesmo na fase estacionária aumentando o número de sítios disponíveis para a troca iônica favorecendo assim a retenção dos compostos avaliados. Já para a coluna fenil, o mecanismo predominante é o da formação do par iônico na fase móvel onde a retenção dos compostos se dá por hidrofobia, a qual diminui com o aumento da concentração do ácido.

## Resultados e Discussão



**Figura 4.46** – Cromatogramas de análise das amostras de gentamicina, neomicina e estreptomicina (1 mg/mL) utilizando a coluna Fenil (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01 M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

## Resultados e Discussão



**Figura 4.47** – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina utilizando as Colunas Fenil e C<sub>18</sub> (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: TFA (0,005, 0,01 M), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 115 °C , Vazão do Gás (ar comprimido): 3,2 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

#### 4.2.2 - AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO O AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO HFBA NAS COLUNAS C<sub>18</sub> E FENIL

O ácido HFBA foi avaliado nas mesmas concentrações do TFA, no entanto nenhuma banda cromatográfica foi observada indicando a não eluição dos antibióticos. Deste modo, para aumentar a força da fase móvel, foi utilizado metanol como modificador orgânico na proporção CH<sub>3</sub>OH/HFBA (60:40) mantendo as concentrações do ácido anteriormente avaliadas.

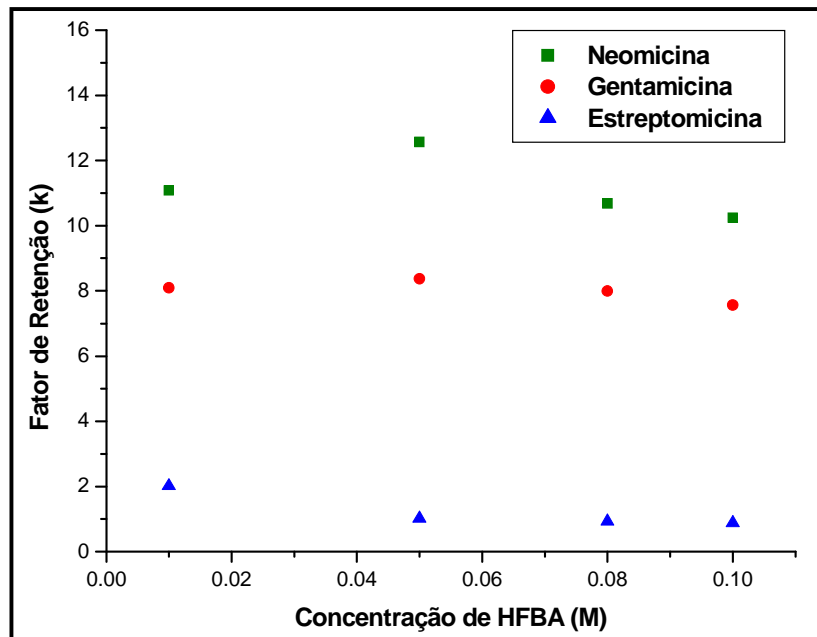
As condições do detector de espalhamento de luz foram novamente otimizadas de acordo com a porcentagem de CH<sub>3</sub>OH adicionada na fase móvel para eficiente nebulização, evaporação e detecção dos antibióticos avaliados. As condições otimizadas foram mais brandas, uma vez que a porcentagem de fase aquosa na fase móvel é menor facilitando o processo de nebulização e evaporação. A temperatura do tubo foi 94,3 °C, a vazão do gás (ar comprimido) 2,5 L/min, o ganho 1 e o impactor: off.

Os resultados obtidos utilizando a concentração de 0,005M foram descartados para evitar erros nos cálculos dos fatores de retenção, uma vez que os cromatogramas obtidos apresentaram dúvidas com relação à observação das bandas cromatográficas. Para as outras concentrações foi possível a observação de bandas cromatográficas intensas para os três aminoglicosídeos avaliados e uma separação parcial dos componentes da gentamicina foi obtida.

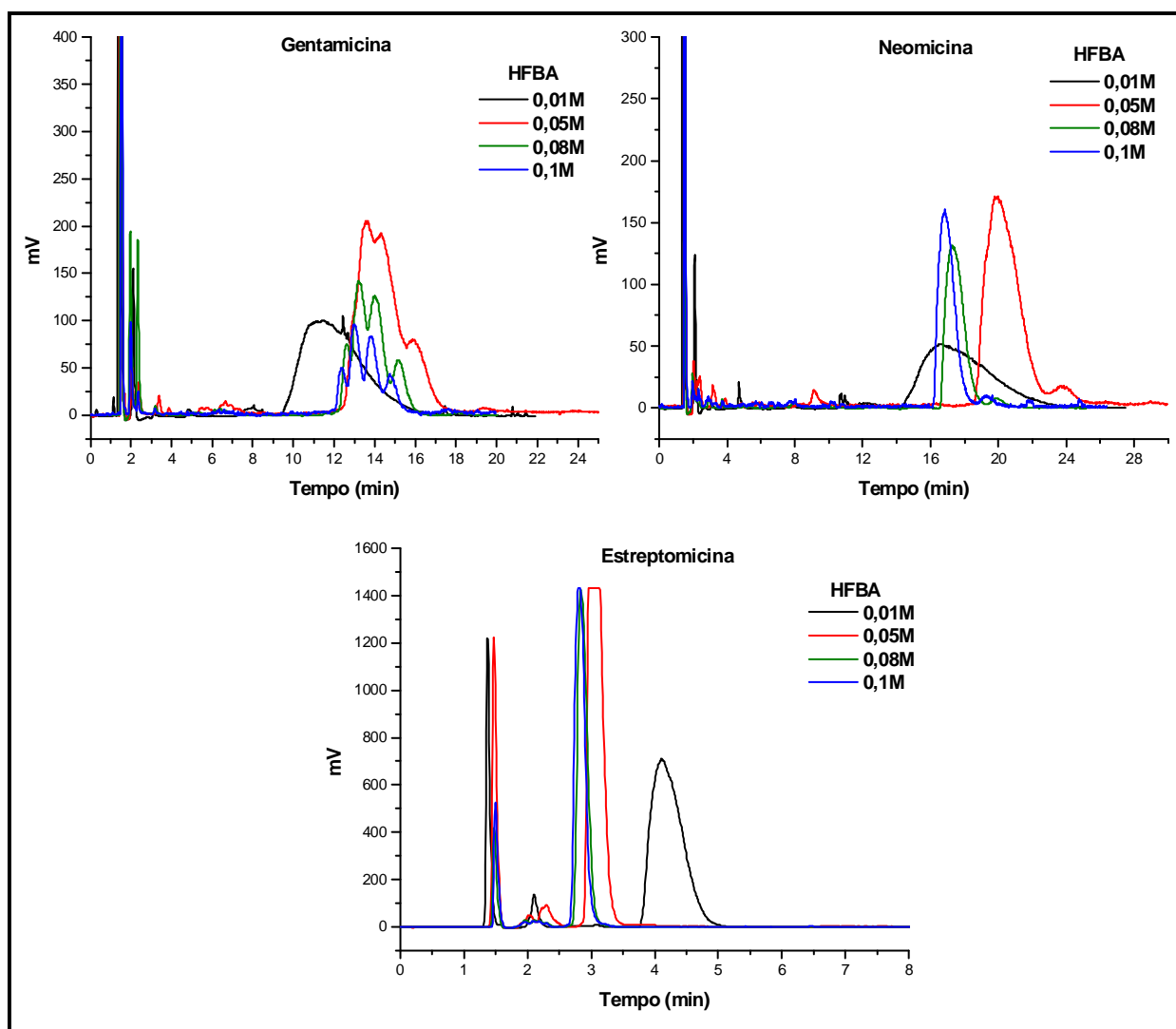
Pouca alteração nos fatores de retenção foi observada com o aumento da concentração do ácido e um leve decréscimo a partir da concentração 0,05 M pode ser observado na **Figura 4.48**. Este decréscimo pode ser justificado pela alta concentração do ácido utilizada levando a uma saturação da superfície da coluna cromatográfica diminuindo sua eficiência, além de uma possível competição do



contra-íon do agente de pareamento pela formação do par iônico na superfície da coluna cromatográfica influenciando o mecanismo de retenção. A **Figura 4.49** mostra os cromatogramas obtidos.



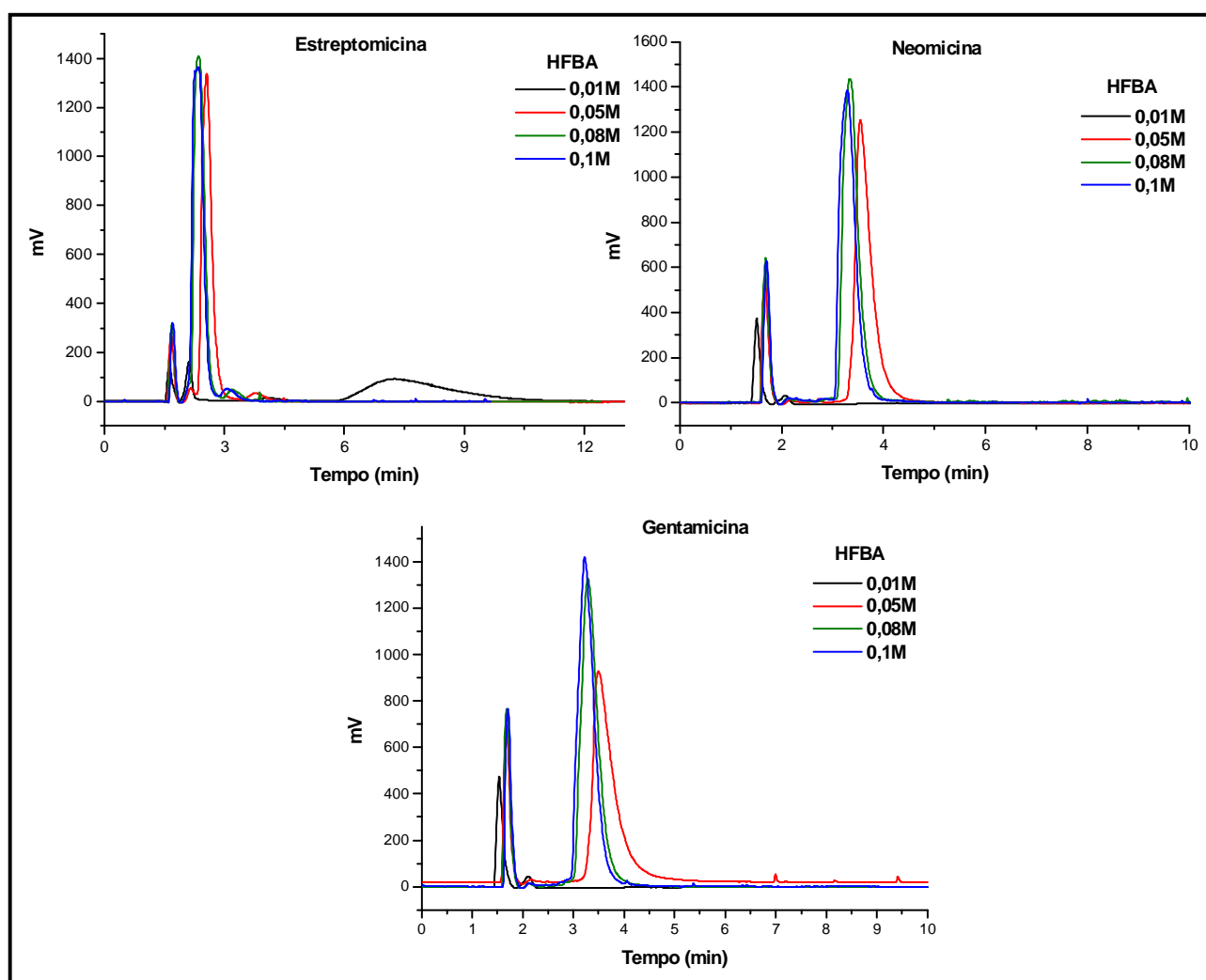
**Figura 4.48** – Influência da concentração de HFBA no fator de retenção (k) dos antibióticos neomicina, gentamicina e estreptomicina.



**Figura 4.49** – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina, utilizando a coluna  $C_{18}$  (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/HFBA (0,01, 0,05, 0,08 e 0,1M) (60:40), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15  $\mu$ L. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 94,3  $^{\circ}$ C, Vazão do Gás (ar comprimido): 2,5 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

As mesmas condições de análise foram também aplicadas para a coluna fenil, e os resultados obtidos foram semelhantes. Nenhuma diferença significativa no tempo de retenção foi observada com o aumento das concentrações (**Figura 4.50**). Para a gentamicina, diferentemente do observado para o TFA, nenhuma separação parcial foi obida.

Assim como o TFA, o HFBA apresentou os mesmos mecanismos de formação do par iônico nas duas colunas cromatográficas, o mecanismo de formação do par iônico na fase móvel e retenção por hidrofobia para a coluna fenil e, o mecanismo de formação do par iônico na fase estacionária com retenção por troca iônica para a coluna C<sub>18</sub>.



**Figura 4.50** – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina utilizando a coluna Fenil (Hypersil 15x0,41 cm d.i). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/HFBA (0,01, 0,05, 0,08 e 0,1M) (60:40), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 15 uL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 94,3 °C, Vazão do Gás (ar comprimido): 2,5 L/min, Ganho: 1 e Impactor: off.

#### **4.2.3 - AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO O AGENTE DE PAREAMENTO IÔNICO PFPA NAS COLUNAS C<sub>18</sub> E FENIL**

O ácido PFPA foi também avaliado como agente de pareamento iônico. As concentrações avaliadas foram 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1M.

Assim como no uso de HFBA, os antibióticos avaliados não eluíram com uma fase móvel de 100% de PFPA em todas as concentrações estudadas. Deste modo, para tornar a fase móvel mais forte foi utilizada a mistura 50:50 CH<sub>3</sub>OH/PFPA nas concentrações do ácido avaliadas.

As condições do detector de espalhamento de luz foram otimizadas de acordo com a porcentagem de metanol na fase móvel para eficiente nebulização, evaporação e detecção dos antibióticos avaliados. A temperatura do tubo foi otimizada em 87,5 °C, a vazão do gás (ar comprimido) 2,6 L/min, o ganho 1 e o impactor: off.

Para o antibiótico estreptomicina, na coluna C<sub>18</sub>, o fator de retenção diminuiu com o aumento da concentração do ácido. Para a gentamicina e neomicina essa diminuição também foi observada até a concentração 0,05M e a partir desta um leve aumento pode ser verificado; assim como uma separação parcial dos componentes da gentamicina.

Na retenção por cromatografia de pareamento iônico a concentração do agente de pareamento iônico pode levar a mudanças de mecanismo de retenção de modo reverso para troca-iônica. Considerando o mecanismo de troca-iônica dois fatores são importantes: 1) a saturação da fase estacionária - que depende da relação de concentração do agente de pareamento iônico na fase móvel pela concentração na fase estacionária e 2) a competição entre o contra-íon do agente de pareamento iônico e o analito, pelo agente pareante adsorvido na fase estacionária.

Fazendo estas considerações, pode-se inferir que a diminuição na retenção da estreptomicina com o aumento da concentração do agente de pareamento iônico pode ter ocorrido pelo mecanismo de troca iônica com a competição do contra-íon do agente pareante.

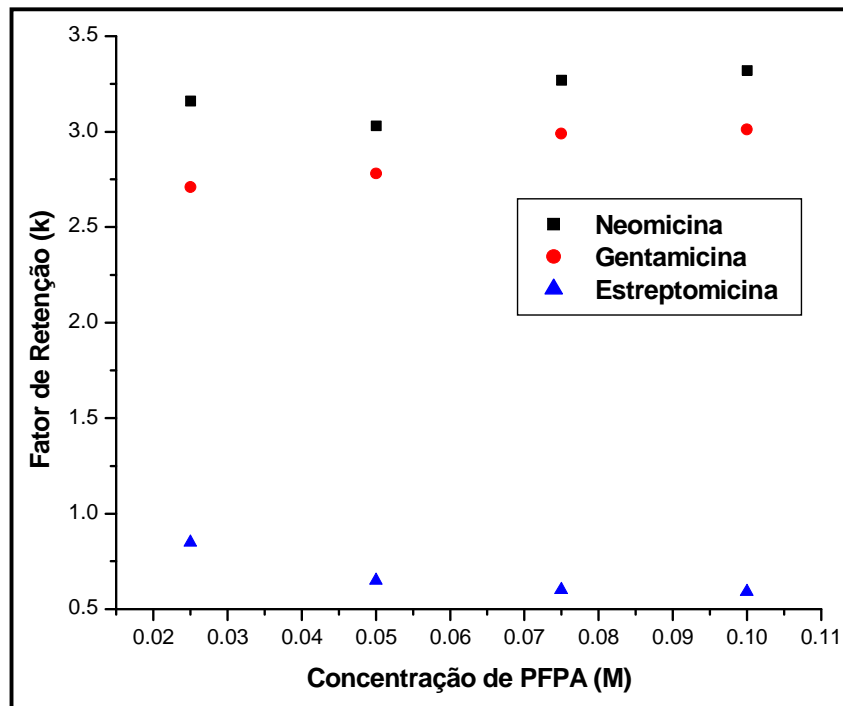
Para a neomicina e gentamicina o alto fator de retenção observado indica que o mecanismo inicial é de retenção no modo reverso; e o decréscimo observado até a concentração 0,05M pode ser explicado devido a uma transição entre os mecanismos de modo reverso e troca-iônica; uma vez que após este decréscimo nenhuma alteração significativa no valor do fator de retenção foi observada.

Dentre os três compostos avaliados, a formação do par iônico foi mais eficiente para a neomicina, a qual apresentou maior valor de fator de retenção ( $k$ ) em todas as concentrações avaliadas do PFPA usado na fase móvel.

A **Figura 4.51** mostra a relação encontrada entre a concentração do agente de pareamento iônico PFPA e o fator de retenção dos compostos e a **Figura 4.52** mostra os cromatogramas obtidos para este estudo.

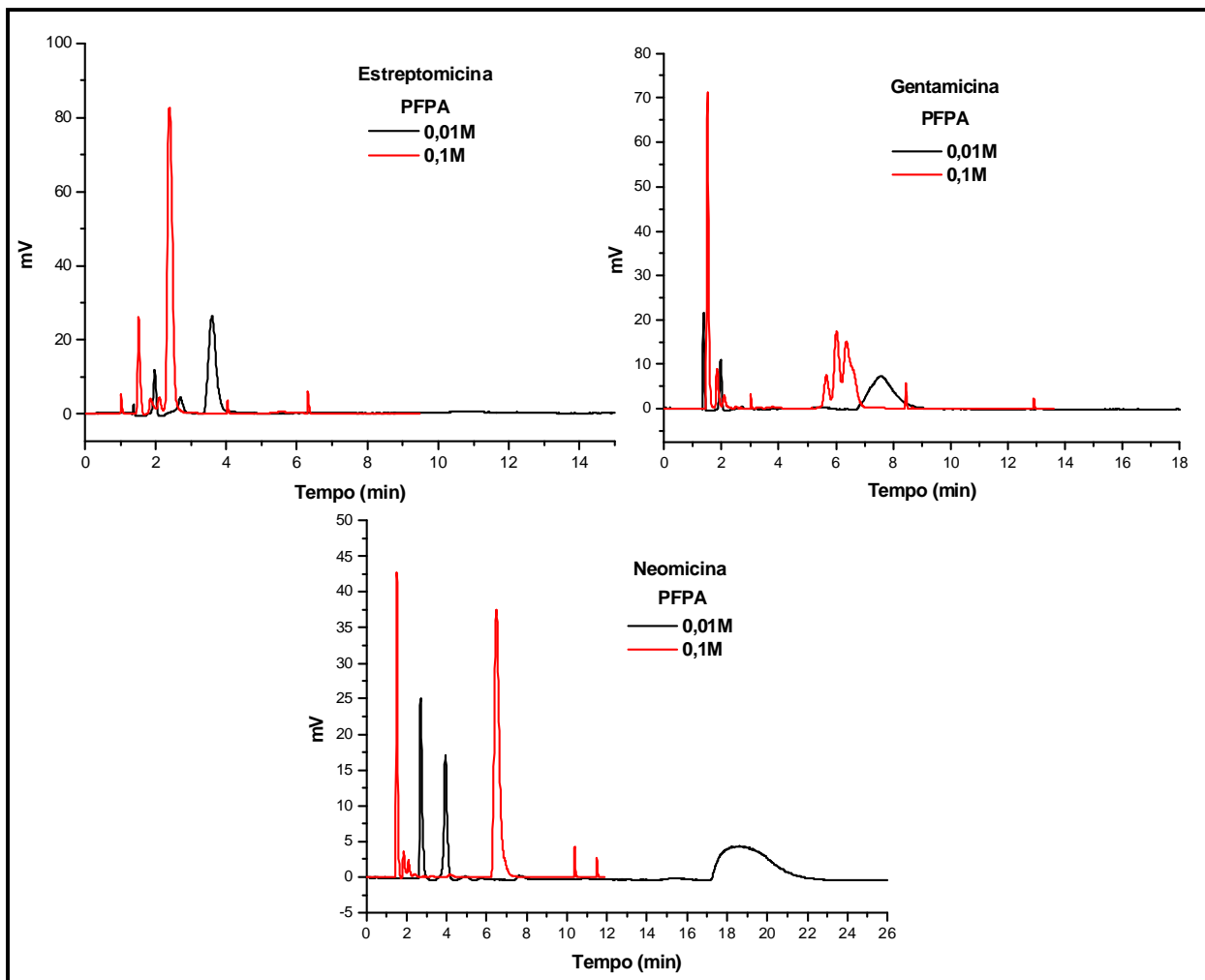
A coluna fenil apresenta uma fase estacionária com maior polaridade do que a coluna  $C_{18}$ , assim, uma saturação desta fase com uma menor concentração do agente de pareamento iônico pode ocorrer. Isto pode ser observado de acordo com os resultados obtidos onde as retenções foram menores do que as obtidas para a coluna  $C_{18}$ .

Foi verificada uma diminuição dos fatores de retenção dos antibióticos aminoglicosídeos com o aumento da concentração do ácido PFPA; pode-se inferir que o mecanismo predominante neste caso é o de troca iônica com uma competição do contra-íon do agente de pareamento com os antibióticos aminoglicosídeos devido a alta concentração de PFPA no meio. A **Figura 4.53** mostra os cromatogramas obtidos.

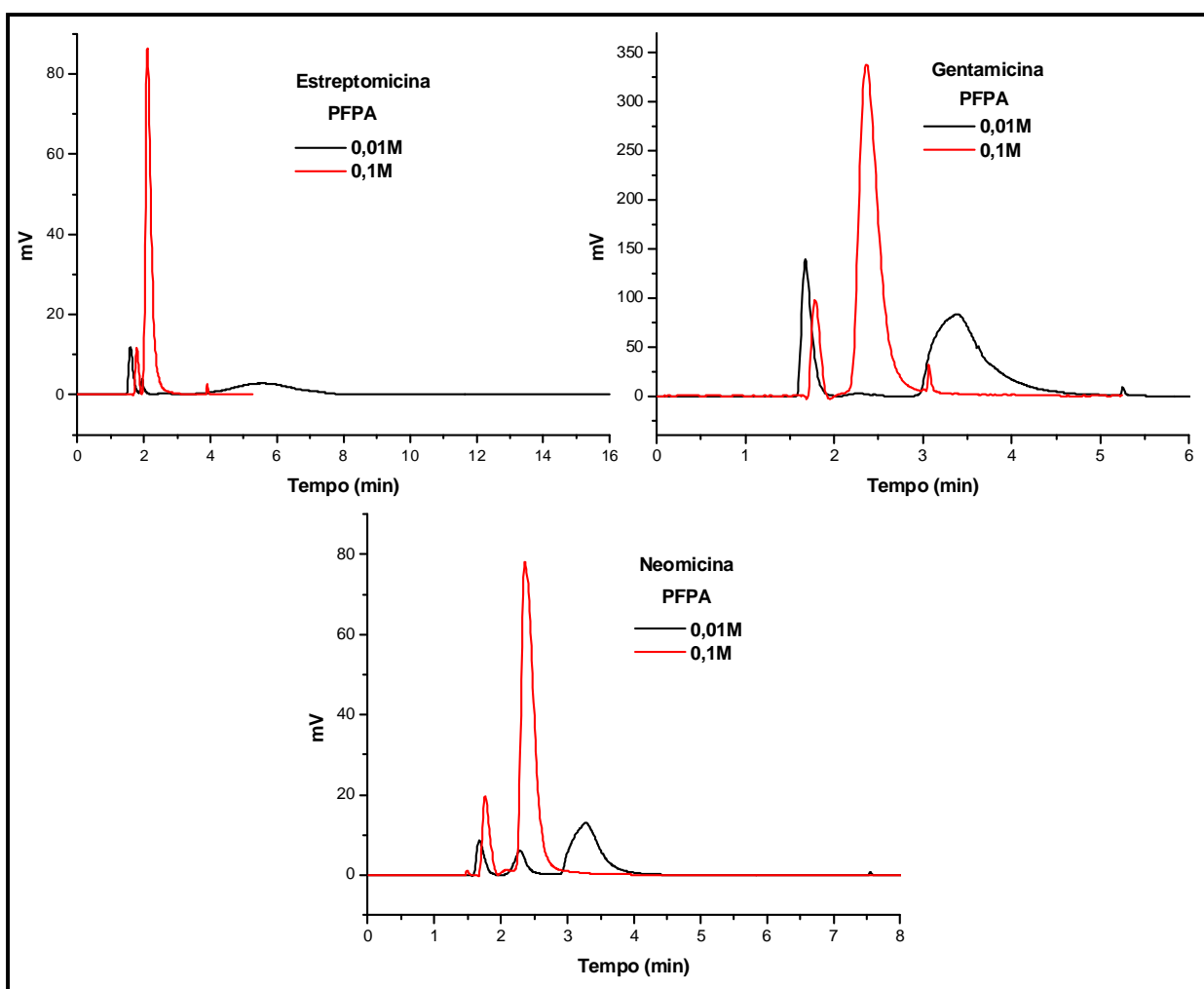


**Figura 4.51** – Influência da concentração de PFPA no fator de retenção (k) dos antibióticos estreptomicina, gentamicina e neomicina.

## Resultados e Discussão



**Figura 4.52** – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina, utilizando a coluna C<sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,46 cm d.i.). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/PFPA (0,01 e 0,1M) (1:1), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 87,5 °C, Vazão do gás (ar comprimido): 2,6 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off.



**Figura 4.53** – Cromatogramas das amostras de neomicina, gentamicina e estreptomicina utilizando a coluna Fenil (Hypersil 15 x 0,46 cm d.i.). Condições Cromatográficas: FM: MEOH/PFPA (0,01 e 0,1M) (1:1), Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15  $\mu$ L. Condições do ELSD: Temperatura do Tubo: 87,5  $^{\circ}$ C, Vazão do gás (ar comprimido): 2,6 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off.

De acordo com esse estudo, foi possível verificar o comportamento cromatográfico dos antibióticos aminoglicosídeos gentamicina, estreptomicina e neomicina em cromatografia de pareamento iônico utilizando os ácidos TFA, PFPA e HTBA nas colunas  $C_{18}$  e fenil.

Este estudo é de fundamental importância para o desenvolvimento de métodos de análise direta dos mesmos, uma vez que a maioria dos métodos



descritos faz uso de derivação pós-coluna para detecção por ultravioleta e/ou fluorescência.<sup>154</sup>

Baseado neste estudo, condições cromatográficas para o desenvolvimento de métodos de análise de controle de qualidade para medicamentos veterinários contendo estes antibióticos, foram também investigados.

#### **4.3 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS**

Os antibióticos aminoglicosídeos são amplamente utilizados na medicina veterinária no tratamento de mastites e outras doenças relacionadas, apresentam alta toxicidade, de modo que deve ser realizado um controle adequado destes compostos como ativos em medicamentos.

Uma vez que os aminoglicosídeos não apresentam grupos cromóforos, a maioria dos métodos analíticos utilizados faz uso de derivação da amostra com detecção por fluorescência.<sup>154</sup> Entretanto, técnicas de derivação apresentam várias desvantagens, influenciadas por parâmetros experimentais como reação de derivação incompleta, interferência dos reagentes, longo tempo de preparo da amostra, entre outros.

Uma alternativa aos métodos de derivação é a detecção direta dos aminoglicosídeos utilizando detectores universais como espectrometria de massas (EM), índice de refração (IR) e o detector de espalhamento de luz (ELSD).

Dentre esses detectores o ELSD tem se destacado como um detector simples, sensível e eficiente para este tipo de análise. Ao contrário do IR, não é um detector sensível a alterações de temperatura podendo também ser usado em eluições gradiente sem mudanças significativas na linha de base. Com relação ao

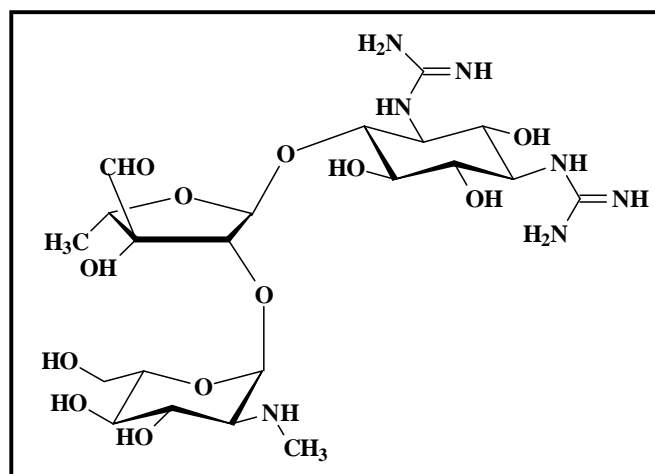
EM, o ELSD, embora menos sensível, destaca-se por ser uma técnica mais simples e relativamente barata.

Levando em consideração os resultados obtidos nos estudos descritos no **item 4.2** e a necessidade de métodos de análise simples e diretos, foram selecionados a coluna analítica C<sub>18</sub> e o ácido TFA na concentração de 0,05M para o desenvolvimento de métodos analíticos de controle de qualidade de medicamentos veterinários com detecção por ELSD.

#### 4.3.1. - QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ESTREPTOMICINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A estreptomicina (**Figura 4.54**) é um importante antibiótico pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos. É produzido pelo fungo *streptomyces griseus* e é particularmente ativo contra bactérias aeróbicas gram-negativas.<sup>155</sup>

Este antibiótico é bastante utilizado na apicultura<sup>156</sup> para proteger as abelhas contra uma série de doenças e especialmente como medicamento veterinário no tratamento da mastite e outras doenças relacionadas.



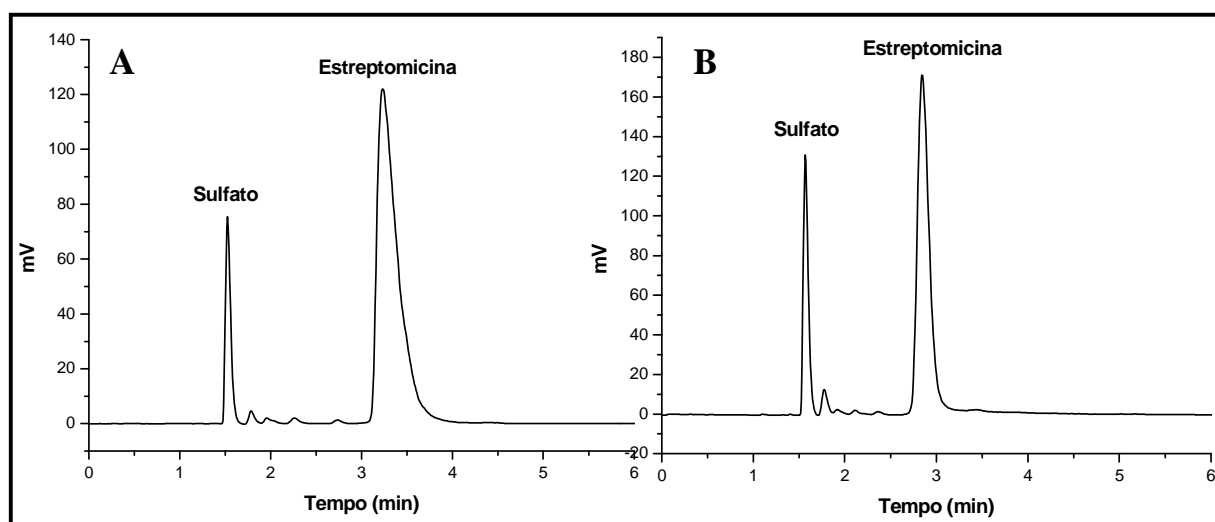
**Figura 4.54** – Estrutura química da estreptomicina.

#### 4.3.1.1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Embora, de acordo com o estudo realizado, boa seletividade tenha sido obtida com a utilização da fase móvel 100% TFA 0,05M (**Figura 4.55A**), visando proporcionar uma proteção para a coluna utilizada, pequenas porcentagens de metanol foram adicionadas na fase móvel. As condições avaliadas foram: TFA (0,05M)/MeOH (99:01 v/v) e (97:03 v/v).

De acordo com os cromatogramas obtidos pôde-se verificar que a presença do metanol leva a bandas cromatográficas mais finas e, como esperado, com menores tempos de retenção.

Dentre as fases móveis avaliadas, a que faz uso de 1% de metanol foi selecionada por apresentar um cromatograma com tempo de análise adequado e melhor simetria de banda. A **Figura 4.55B** mostra o cromatograma com a condição selecionada para análise.



**Figura 4.55** – Cromatogramas de análise de uma amostra de estreptomicina (500 µg/mL) utilizando a coluna C<sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10 µm). Condições cromatográficas: FM: **A**) TFA 0,05M e **B**) TFA (0,05M)/MeOH (99:01 v/v); Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL.

Com as condições cromatográficas estabelecidas, o método desenvolvido foi validado. As figuras de mérito avaliadas foram linearidade, precisão, inter e intradia, exatidão e limites de quantificação e detecção.

As análises foram realizadas utilizando-se a condição cromatográfica e parâmetros do detector descritos na **Tabela 4.11**, e a **Figura 4.56** apresenta o cromatograma obtido durante a validação do método.

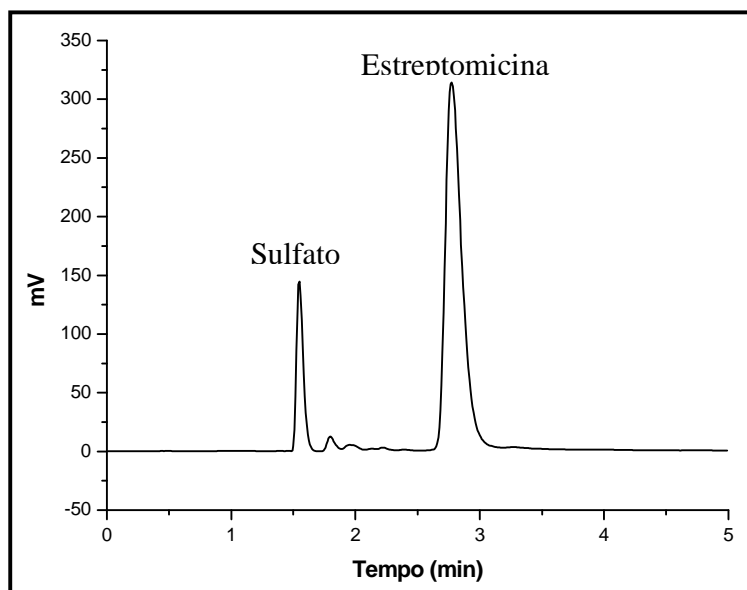
**Tabela 4.11:** Valores otimizados do método LC-ELSD para a análise do antibiótico estreptomicina.

<b>Coluna</b>	C <sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.) (120 Å, 10 µm)
<b>Fase Móvel</b>	TFA (0,05M)/ CH <sub>3</sub> OH (99:01 v/v)
<b>Vazão</b>	1,0 mL/min
<b>Tempo de Análise</b>	5 minutos
<b>Temperatura do Tubo</b>	115 °C
<b>Vazão do Gás (ar comprimido)</b>	3,2 L/min
<b>Ganho</b>	1
<b>Impactor</b>	off

De acordo com os princípios de funcionamento e resposta de detector, para facilitar sua utilização para a quantificação, as curvas de calibração são geralmente plotadas em uma escala logarítmica resultando em uma resposta linear.

Deste modo, utilizando as condições descritas (**Tabela 4.11**) e levando em consideração a pureza do padrão secundário certificado utilizado (75,1% de estreptomicina), a curva de calibração para a estreptomicina (**Figura 4. 57**) foi obtida em função das áreas das bandas cromatográficas relativas as seguintes concentrações de estreptomicina: 0,10; 0,20; 0,35; 0,50; 0,60; 0,75; 0,90 e 1,0 mg/mL de acordo com a curva de calibração logarítmica  $\log A = \log C_{\text{mg/mL}} + \log$

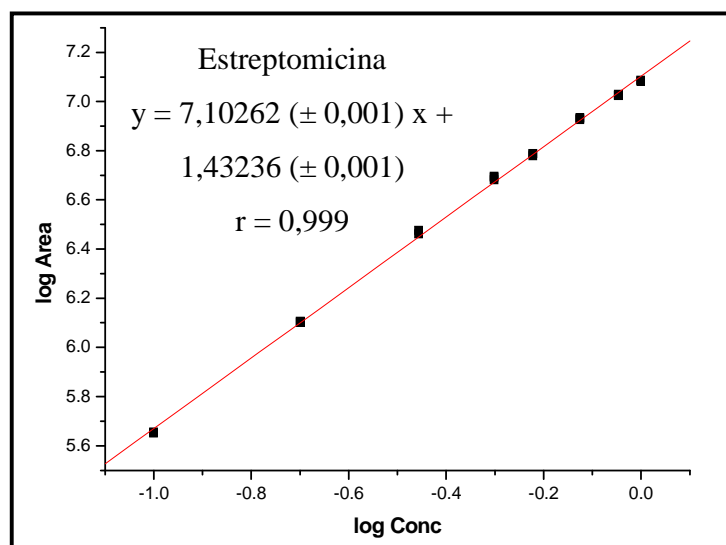
$\alpha$ . As amostras foram preparadas, em triplicata, em TFA 0,05M, para cada concentração, injetadas (15 $\mu$ L) e a curva mostrou-se linear na faixa de concentração utilizada. O desvio padrão da regressão linear foi de 0,001 para ambos os coeficientes de correlação linear e angular da curva.



**Figura 4.56** – Cromatograma típico obtido da análise da estreptomicina na concentração de 0,35 mg/mL durante a validação do método.

A precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas foi inferior a 2% e a exatidão apresentou um desvio menor que 5% do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva incluindo para o LQ.

A precisão e exatidão, intra e interdias do método, foi determinada analisando-se as quintuplicatas dos três controles de qualidade (0,12; 0,40 e 0,80 mg/mL), em um mesmo dia e em dias não consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi avaliada através da interpolação dos resultados na curva de calibração e expressa como percentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas nas três concentrações examinadas. Os resultados estão mostrados na **Tabela 4.12**.



**Figura 4.57** – Curva de Calibração obtida para a estreptomicina.

A precisão apresentou para as quintuplicatas das amostras, CV de 0,380 a 1,86%, e a exatidão apresentou valores de 94,6 a 105% da concentração nominal. Todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação do método com variabilidades menores ou iguais a 2 e 5%, respectivamente.<sup>157</sup>

A exatidão do método foi também avaliada pela análise de duas amostras de concentrações desconhecidas ao analista e chamado de teste cego. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.13**.

**Tabela 4.12:** Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise da estreptomicina.

Concentração <sup>a</sup> (mg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0.12	101	1.05	95.5	1.76	94.6	0.380	96.9	1.06
0.40	105	1.75	102	1.90	97.1	1.86	101	1.84
0.80	98.4	1.65	98.7	0.870	97.1	0.940	98.1	1.15

<sup>a</sup> Concentração teórica

**Tabela 4.13:** Precisão e exatidão obtidas para a estreptomicina no teste cego (n=3).

	Concentração adicionada (mg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Amostra 1	0,195	1,02	98,1
Amostra 2	0,650	2,00	96,2

O critério de aceitação para o limite de quantificação foi que a precisão e a exatidão das triplicatas não ultrapassassem o valor de 2 e 5% de variabilidade respectivamente <sup>157</sup>, enquanto que o limite de detecção foi calculado obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector. Os valores obtidos foram de 0,0175 mg/mL e de 0,0091 mg/mL para os limites de quantificação e detecção, respectivamente.

#### 4.3.1.2 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DE ESTREPTOMICINA

O método foi aplicado e dois diferentes medicamentos veterinários (Estreptomax® - Ouro Fino e estreptomicina – Fort Dodge) foram avaliados em triplicata. Para a análise, o conteúdo de dois frascos foi pesado e misturado e considerando o valor do rótulo, três amostras em uma mesma concentração foram preparadas para análise.

A precisão e exatidão obtidas não ultrapassaram os valores de 2 e 5% aceitos. Os resultados encontrados estão descritos na **Tabela 4.14**.

Os valores encontrados para os medicamentos analisados (5,5 g para a amostra 1 e 5,3 g para a amostra 2) estavam em conformidade com os rótulos (5,0 g de estreptomicina).

É importante destacar que a seletividade para a estreptomicina no produto acabado não foi avaliada. Esta avaliação poderia ser realizada pela análise de um placebo, fornecido pelas empresas veterinárias, ou então pela construção de uma curva de calibração utilizando o método de adição de padrão. No entanto, nenhum desses procedimentos foi realizado.

**Tabela 4.14:** Exatidão, precisão e concentração experimental obtida na análise em triplicata da estreptomicina em medicamentos veterinários de acordo com o método desenvolvido.

	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>
Concentração Teórica (mg/mL)	0,60	0,60
Concentração Encontrada (mg/mL)	0,64	0,66
CV (%)	0.50	0.71
Exatidão (%)	106	111

#### **4.3.2 - QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO GENTAMICINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS**

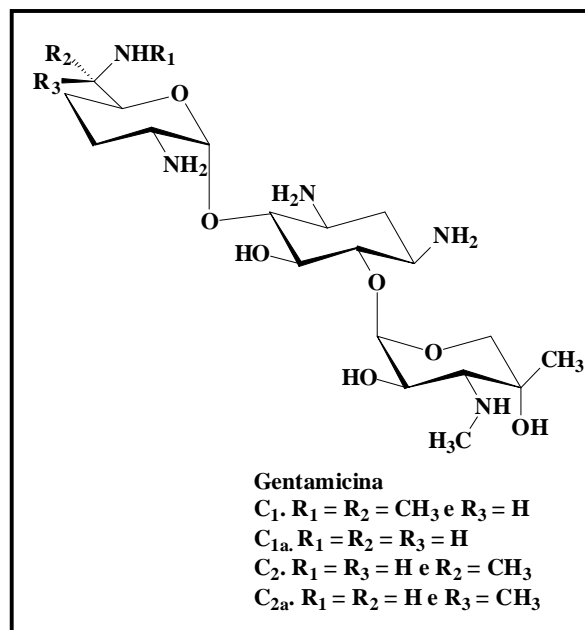
A gentamicina (sulfato), antibiótico produzido pelo fungo *Micromonospora purpúrea* e efetivo contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas, consiste principalmente de quatro substâncias análogas designadas como C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>2a</sub> (**Figura 4.58**).<sup>31</sup>

O método oficial para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas, segundo a farmacopéia americana<sup>159</sup>, é um método microbiológico, o qual demanda um longo tempo de análise. Além disso, a falta de material de referência padrão dos constituintes da gentamicina dificulta a quantificação direta de cada componente, de modo que a análise cromatográfica é limitada à



determinação da fração relativa, a qual é influenciada pelas diferentes absorvidades de cada componente (fator de resposta).

Aproveitando a vantagem do ELSD de apresentar fatores de resposta semelhantes para moléculas com massa molecular e com fórmulas estruturais semelhantes e levando em consideração a falta de padrões para cada componente da gentamicina, MEGOULAS e KOUPPARIS <sup>31</sup> apresentaram um estudo envolvendo o desenvolvimento e validação de um método de análise dos componentes do sulfato de gentamicina em formulações farmacêuticas por LC-ELSD, utilizando os valores de coeficiente linear e angular de uma equação de reta obtida a partir de uma curva de calibração construída para um composto semelhante a gentamicina, denominado canamicina.



**Figura 4.58** – Estrutura química dos componentes da gentamicina.

Segundo o estudo, levando em consideração a resposta do detector de espalhamento de luz (ELSD), o coeficiente linear e angular das curvas de calibração logarítmica dos componentes da gentamicina e da canamicina devem ser

estatisticamente iguais. No entanto, para a quantificação dos componentes da gentamicina deve ser introduzido um fator de correção das proporções de cada componente ( $x$ ).

De acordo com esses parâmetros foram construídas as regressões lineares dos componentes da gentamicina e realizadas as quantificações de cada composto em quatro formulações comerciais.<sup>31</sup> Deste modo, a canamicina foi utilizada como padrão externo secundário para a quantificação das substâncias que compõem o antibiótico gentamicina.

Baseando-se no estudo realizado, foram desenvolvidos dois métodos de análise; um utilizando a gentamicina como padrão externo levando em consideração a pureza do padrão e as proporções das respectivas áreas de cada componente da mistura e o outro baseado no método de MEGOULAS e KOUPPARIS<sup>31</sup> com a utilização da canamicina como padrão externo secundário. Isso foi feito para avaliar a necessidade de uso de um padrão diferente da gentamicina.

#### **4.3.2.1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS**

A alta seletividade apresentada pela gentamicina utilizando o ácido TFA e a analítica coluna C<sub>18</sub> permitiu um estudo de otimização das condições cromatográficas mantendo a alta resolução obtida em um menor tempo de análise. Foram avaliadas nesse estudo as seguintes fases móveis:

- TFA (0,05M)/CH<sub>3</sub>CN (95:05) (v/v)
- TFA (0,05M)/CH<sub>3</sub>CN (96:04) (v/v)
- TFA (0,05M)/CH<sub>3</sub>CN (97:03) (v/v)

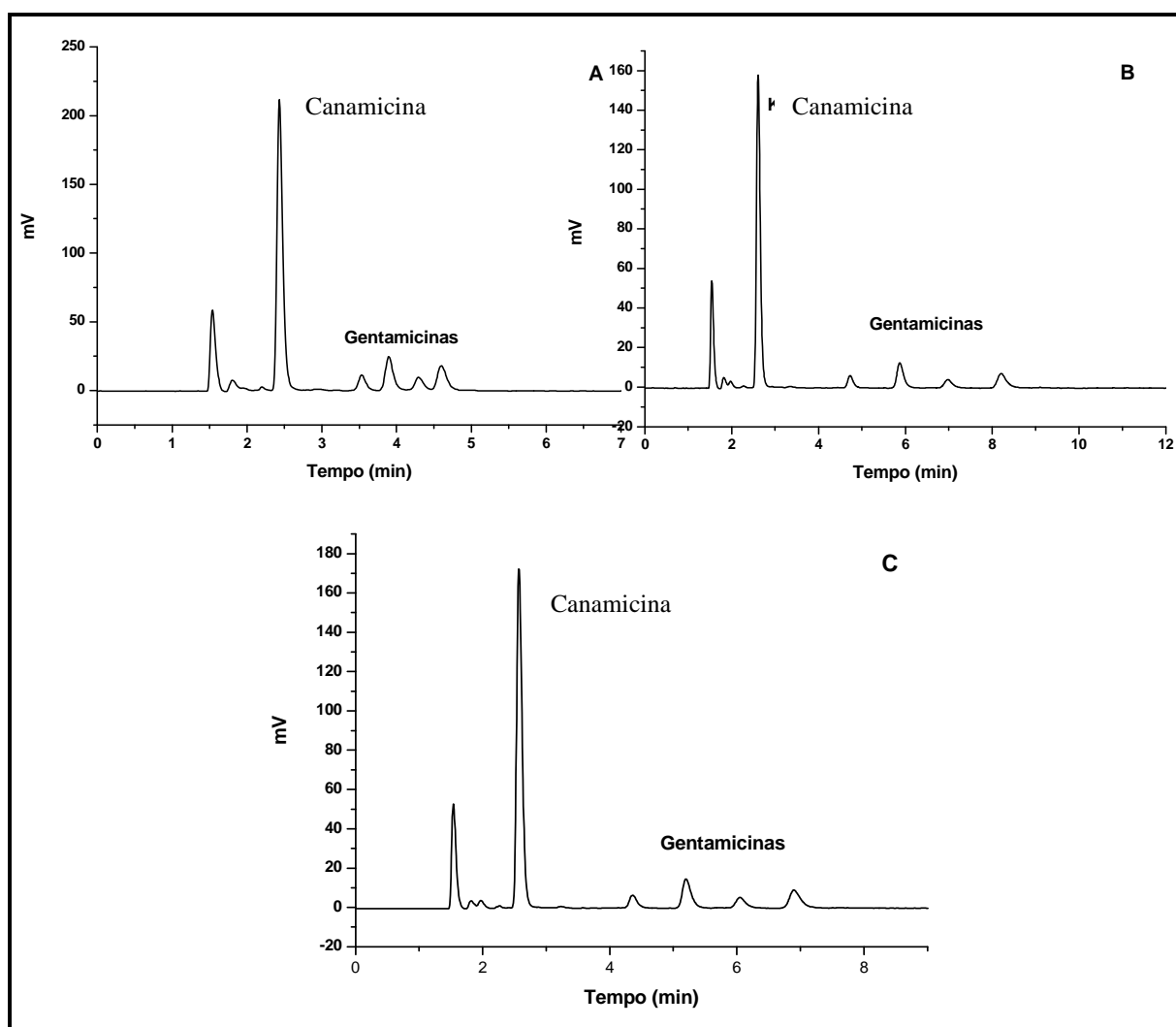
A **Figura 4.59** mostra os cromatogramas obtidos e dentre as fases móveis avaliadas, a que faz uso de 3% de acetonitrila foi selecionada por apresentar um cromatograma com excelente resolução e tempo de análise adequado.

Foi feita a análise da solução padrão de canamicina, nas mesmas condições selecionadas para separação da gentamicina. Nessas condições, foi possível analisar a canamicina e os 4 componentes da gentamicina com alta seletividade e resolução para todos os componentes da amostra.

São apresentados na **Tabela 4.15** as condições cromatográficas e os parâmetros do detector otimizados para a análise dos antibióticos gentamicina e canamicina

Considerando as respectivas polaridades dos componentes da gentamicina, a ordem de eluição designada para a condição cromatográfica utilizada foi  $C_{1a}$ ,  $C_2$ ,  $C_{2a}$  e  $C_1$ . Esta ordem de eluição também está de acordo com a ordem de eluição proposta por MEGOULAS<sup>31</sup> no trabalho acima citado.

Com as condições cromatográficas estabelecidas, os métodos desenvolvidos envolvendo a análise simultânea da canamicina e da gentamicina foram validados, e as figuras de mérito analíticas avaliadas foram linearidade, precisão inter e intradia, exatidão e limites de quantificação e detecção.



**Figura 4.59** – Cromatogramas de análise da gentamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando a coluna  $\text{C}_{18}$  (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120  $\text{\AA}$ , 10  $\mu\text{m}$ ). Condições cromatográficas: **A**: TFA (0,05M)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (95:05), **B**: TFA (0,05M)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (96:04) e **C**: TFA (0,05M)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (97:03). Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15  $\mu\text{L}$ . Condições do ELSD: Temperatuta do tubo: 113,6  $^\circ\text{C}$ , Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impactro: off.

**Tabela 4.15:** Valores otimizados do método LC-ELSD para a análise dos antibióticos gentamicina e canamicina.

<b>Coluna</b>	C <sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.) (120 Å, 10 µm)
<b>Fase Móvel</b>	TFA (0,05M)/ CH <sub>3</sub> CN (97:03 v/v)
<b>Vazão</b>	1,0 mL/min
<b>Tempo de Análise</b>	5 minutos
<b>Temperatura do Tubo</b>	113,6 °C
<b>Vazão do Gás (ar comprimido)</b>	3,1 L/min
<b>Ganho</b>	1
<b>Impactor</b>	off

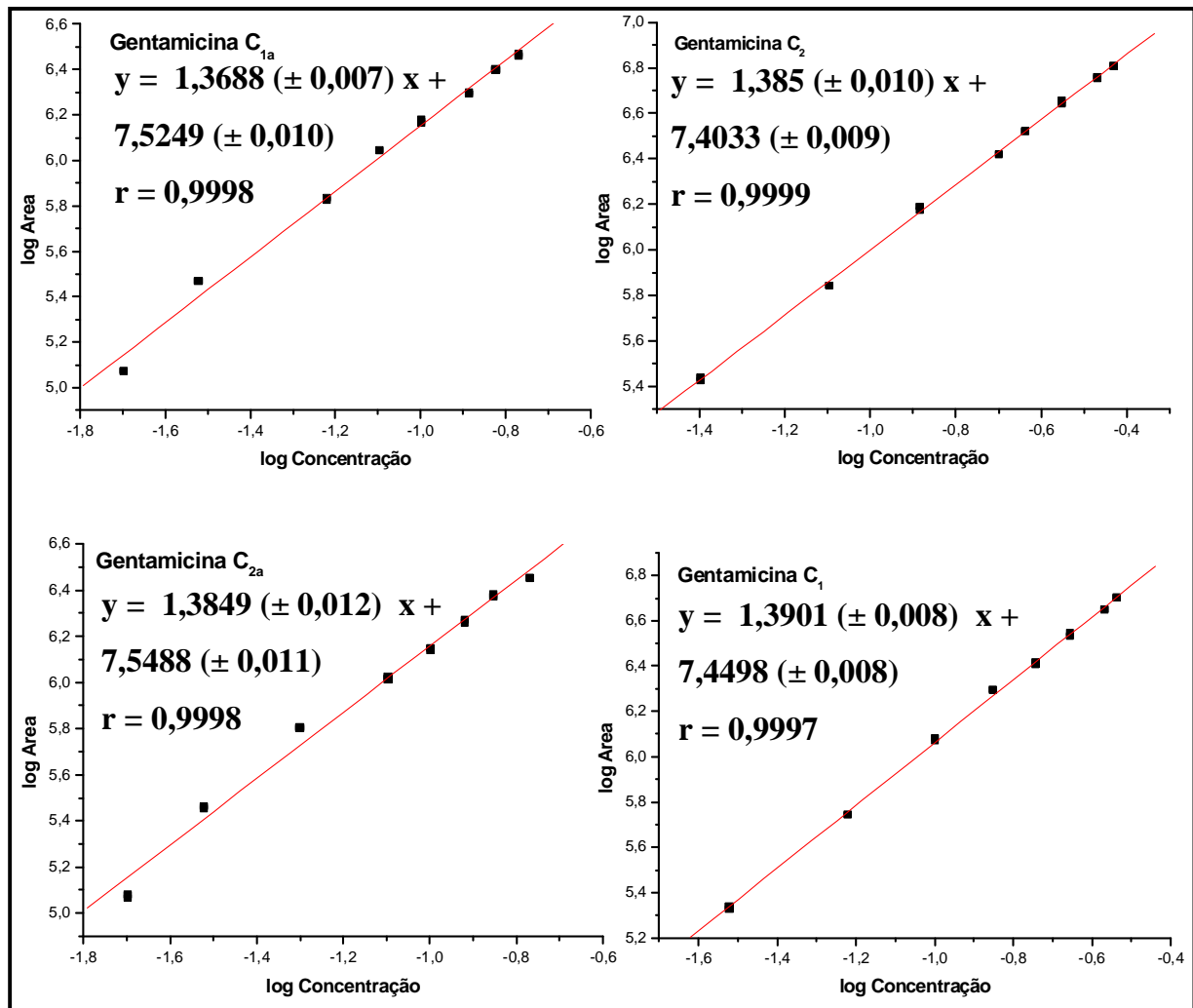
#### 4.3.2.1.1 - PADRONIZAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO A GENTAMICINA

Utilizando as condições descritas (**Tabela 4.15**) e levando em consideração a pureza do padrão secundário utilizado (62,3% para a mistura de gentamicina), as curvas de calibração para os componentes da gentamicina (**Figura 4.60 A-D**) foram obtidas em função das proporções das áreas das bandas cromatográficas relativas às seguintes concentrações de gentamicina total: 0,100; 0,200; 0,350; 0,500; 0,600; 0,750; 0,900 e 1,00 mg/mL de acordo com a curva de calibração logarítmica  $\log A = b \log C_{\text{mg/mL}} + \log \alpha$ . As soluções de calibração foram preparadas e analisadas (20µL) em triplicata em TFA 0,050M, para cada concentração. As curvas analíticas mostraram-se linear nas faixas de concentração utilizadas (**Tabela 4.16**). O desvio padrão da regressão linear para o coeficiente angular foi de 0,007; 0,010; 0,012; 0,008 para as gentamicinas C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>1</sub>, respectivamente. Para o coeficiente de correlação linear os valores obtidos foram de 0,010; 0,009; 0,011; 0,008 para as gentamicinas C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>1</sub>, respectivamente.

É importante destacar que os valores obtidos para os coeficientes linear e angular de todas as equações de reta são bastante semelhantes entre si, ratificando que compostos semelhantes apresentam respostas similares pelo detector de ELSD. Deste modo, pode-se inferir que a validação utilizando a própria gentamicina como padrão externo é confiável, uma vez que os compostos são extremamente semelhantes entre si.

**Tabela 4.16:** Concentrações dos componentes da gentamicina.

<b>Gentamicina</b>	<b>Concentrações (mg/mL)</b>
C <sub>1a</sub>	0,016; 0,032; 0,059; 0,082; 0,102; 0,126; 0,150 e 0,168
C <sub>2</sub>	0,037; 0,076; 0,133; 0,196; 0,226; 0,284; 0,341 e 0,374
C <sub>2a</sub>	0,016; 0,031; 0,054; 0,077; 0,096; 0,119; 0,142 e 0,165
C <sub>1</sub>	0,030; 0,061; 0,104; 0,144; 0,175; 0,221; 0,267 e 0,293



**Figura 4.60** – Curvas de calibração obtida para os componentes da gentamicina.

As precisões, expressas pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas, foram inferiores a 2% e as exatidões apresentaram um desvio menor que 5% do valor nominal de concentração em todas as concentrações para as quatro curvas obtidas, incluindo para os LQs.

As precisões e exatidões, intra e interdias dos métodos, foram determinadas analisando-se quintuplicatas dos três controles de qualidade (0,120; 0,400 e 0,800 mg/mL de gentamicina total), em um mesmo dia e em dias não consecutivos, respectivamente. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação

(CV%) e a exatidão foi avaliada através da interpolação dos resultados na curva de calibração e expressa como percentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas nas três concentrações examinadas. Os resultados estão mostrados na **Tabela 4.17**.

A precisão apresentou para as replicatas das amostras CV de 0,52 a 2%, enquanto a exatidão valores de 92,6 a 115 das concentrações nominais. Todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação do método com variabilidade menores ou iguais a 2 e 15% respectivamente.

Foi também avaliada a exatidão do método pela análise de duas amostras de concentrações desconhecidas ao analista e chamado de teste cego. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.18**.

O critério de aceitação para o limite de quantificação foi que a precisão e a exatidão de três amostras não ultrapassassem o valor de 2 e 15% de variabilidade respectivamente <sup>157</sup>, enquanto que o limite de detecção foi calculado considerando um sinal três vezes maior que o ruído do detector. Os valores obtidos para o limite de quantificação estão apresentados na **Tabela 4.19** e para o limite de detecção na **Tabela 4.20**.



**Tabela 4.17:** Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise dos componentes da gentamicina.

C T <sup>a</sup> (mg/mL)	C P <sup>a</sup> (mg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)		
		Ex (%)	CV (%)	Ex (%)	CV (%)	Ex (%)	CV (%)	Ex (%)	CV (%)	
0.120	C <sub>1a</sub>	0,019	107	0,520	115	1,98	98,2	1,96	110	1,49
	C <sub>2</sub>	0,044	107	1,77	114	0,810	98,9	1,90	110	1,49
	C <sub>2a</sub>	0,019	104	0,670	115	1,81	93,7	1,98	107	1,49
	C <sub>1</sub>	0,036	97,8	1,23	114	1,56	114	2,00	108	1,60
0.400	C <sub>1a</sub>	0,067	101	2,00	107	1,21	99,0	1,73	102	1,65
	C <sub>2</sub>	0,150	104	1,25	110	1,43	102	1,47	105	1,38
	C <sub>2a</sub>	0,066	97,4	1,78	106	1,61	92,6	2,00	98,7	1,80
	C <sub>1</sub>	0,117	100	0,52	108	2,00	108	2,00	105	1,51
0.800	C <sub>1a</sub>	0,134	96,8	1,96	102	1,74	98,7	1,69	99,3	1,80
	C <sub>2</sub>	0,299	99,9	1,49	104	1,85	101	1,89	101	1,74
	C <sub>2a</sub>	0,132	95,7	0,95	103	2,00	94,6	1,32	97,8	1,42
	C <sub>1</sub>	0,234	99,3	1,71	107	2,00	107	1,67	104	1,79

Concentração teórica

CT<sup>a</sup> – Concentração teórica total de gentamicina

CP<sup>a</sup> – Concentração teórica proporcional de gentamicina

Ex - Exatidão

**Tabela 4.18:** Precisão e exatidão obtidas para a neomicina no teste cego (n=3).

Gentamicinas	Concentração adicionada (mg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Amostra 1	0,205 <sup>a</sup>		
C <sub>1a</sub>	0,046	0,790	91,8
C <sub>2</sub>	0,055	2,00	92,0
C <sub>2a</sub>	0,045	1,69	89,9
C <sub>1</sub>	0,059	2,00	98,1
Amostra 2	0,343 <sup>a</sup>		
C <sub>1a</sub>	0,077	0,72	95,7
C <sub>2</sub>	0,096	1,04	96,2
C <sub>2a</sub>	0,076	2,00	94,5
C <sub>1</sub>	0,094	2,00	93,9

<sup>a</sup>Concentração total de gentamicina

**Tabela 4.19:** Limites de Quantificação para os componentes da gentamicina.

Gentamicinas	LQ (mg/mL)
C <sub>1a</sub>	0,012
C <sub>2</sub>	0,028
C <sub>2a</sub>	0,012
C <sub>1</sub>	0,022

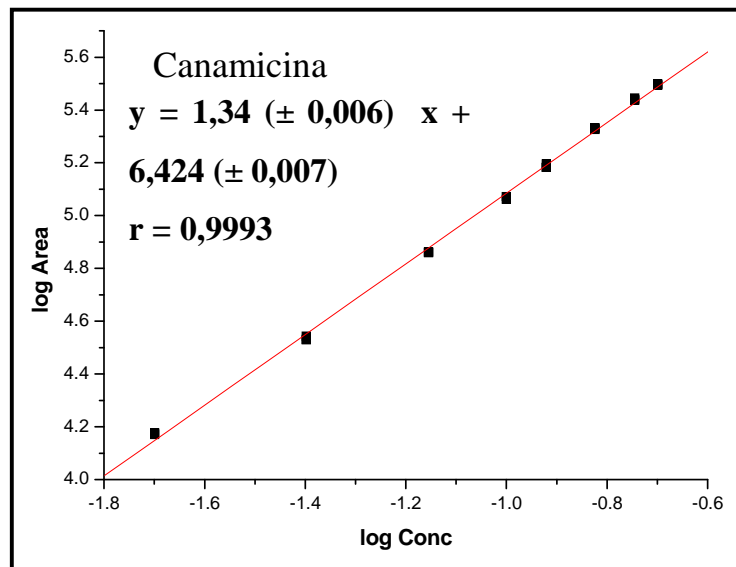
**Tabela 4.20:** Limites de Detecção para os componentes da gentamicina.

Gentamicinas	LD (mg/mL)
1	0,009
2	0,013
3	0,009
4	0,015

#### 4.3.2.1.2 – PADRONIZAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO A CANAMICINA COMO PADRÃO SECUNDÁRIO

Embora os valores necessários para o desenvolvimento do método da gentamicina, utilizando a canamicina como padrão externo secundário, dependesse apenas dos coeficientes linear e angular da reta da canamicina, a análise de precisão e exatidão intra e inter dia foram também avaliadas.

Utilizando as condições descritas (**Tabela 4.15**), a curva de calibração para a canamicina (**Figura 4.61**) foi obtida em função das áreas das bandas cromatográficas relativas às seguintes concentrações de canamicina: 0,020; 0,040; 0,070; 0,100; 0,120; 0,150; 0,180 e 0,200 mg/mL de acordo com a curva de calibração logarítmica  $\log A = b \log C_{\text{mg/mL}} + \log \alpha$ , sendo que para isso as amostras foram preparadas em triplicata em TFA 0,050M, para cada concentração, injetadas (20 $\mu$ L) e a curva mostrou-se linear na faixa de concentração utilizada. O desvio padrão da regressão linear para o coeficiente angular foi de 0,006 e para o coeficiente de correlação linear o valor obtido foi de 0,007.



**Figura 4.61** – Curva de calibração obtida para a canamicina.

A precisão expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas foi inferior a 2% e a exatidão apresentou um desvio menor que 5% do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva incluindo para o LQ.

A precisão e exatidão, intra e interdias do método, foi determinada analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade (0,024; 0,080 e 0,160 mg/mL), em um mesmo dia e em dias não consecutivos, respectivamente. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi avaliada através da interpolação dos resultados na curva de calibração e expressa como percentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações examinadas. Os resultados estão mostrados na **Tabela 4.21**.

**Tabela 4.21:** Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise da canamicina.

Concentração <sup>a</sup> (mg/mL)	1° dia (n=5)		2° dia (n=5)		3° dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,024	96,0	1,74	114	1,20	87,0	1,42	99,1	1,45
0,080	97,6	0,42	110	0,44	91,5	0,86	99,7	0,57
0,160	98,5	1,81	112	1,33	98,2	1,51	103	1,55

<sup>a</sup> Concentração teórica

A precisão apresentou para as replicatas das amostras CV de 0,420 a 1,81%, enquanto a exatidão valores de 87,0 a 112% da concentração nominal. Todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação do método.<sup>157</sup>

A exatidão do método avaliada pelo teste cego, duas amostras de concentrações desconhecidas ao analista, também foi satisfatória e os valores são apresentados na **Tabela 4.22**.

**Tabela 4.22:** Precisão e exatidão obtidas para a canamicina no teste cego (n=3).

	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>
Concentração adicionada (mg/mL)	0,095	0,120
CV (%)	0,92	2,00
Exatidão (%)	97,4	87,9

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação foram 0,008 e 0,015 mg/mL, respectivamente.

#### 4.3.2.1.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DESENVOLVIDOS PARA A GENTAMICINA

De acordo com o método descrito por MEGOULAS e KOUPPARIS<sup>31</sup>, os coeficientes  $a$  e  $b$  das curvas de calibração logarítmica dos componentes da gentamicina e da canamicina devem ser estatisticamente iguais.

$$\log A = b \log m + \log a$$

No entanto para a quantificação dos componentes da gentamicina deve ser introduzido um fator de correção relativo às proporções de cada um dos componentes ( $x$ ) de modo que:

$$\log A = b \log (x m) + \log a$$

$$\rightarrow \log A = b \log m + (\log a + b \log x)$$

Onde:  $x$  é a proporção individual dos componentes da gentamicina total,  $m$  é a concentração de gentamicina total e  $A$  é a área da banda cromatográfica medida.

Deste modo, fazendo-se as substituições na equação obtida para a curva analítica da canamicina tem-se:

$$\log x = (\log A - 1,34 - 6,424 \log m) / 6,424$$

Assim, foram calculados através da equação acima os valores de concentração de cada gentamicina e as respectivas curvas de calibração.

Comparando os valores de coeficientes linear e angular das equações das curvas de calibração obtidas através da canamicina e da própria gentamicina com padrão externo é possível observar semelhanças significativas entre elas. A **Tabela 4.23** apresenta os valores obtidos.

**Tabela 4.23:** Valores de coeficiente linear e angular obtidos para os dois métodos utilizados.

Gentamicina	Coeficiente Linear		Coeficiente Angular	
	MC*	MG*	MC*	MG*
C <sub>1a</sub>	1,1503	1,3688	7,3259	7,5249
C <sub>2</sub>	1,1413	1,3850	6,9884	7,4033
C <sub>2a</sub>	1.1408	1,3849	7,2984	7,5488
C <sub>1</sub>	1,1319	1,3901	7,2346	7,4498

\*MC – método de padronização externa utilizando a canamicina como padrão secundário.

\*MG – método de padronização externa utilizando a gentamicina.

Cabe lembrar que é através dos coeficientes linear e angular da reta que a correlação resposta do detector e concentração do analito é realizada. Deste modo, esses resultados indicam uma grande semelhança entre os métodos, de modo que uma calibração utilizando a própria gentamicina como padrão externo, desde que se tenha uma separação cromatográfica entre elas, apresenta valores tão exatos e precisos quanto os obtidos utilizando métodos de padronização externa.

Para confirmar os resultados obtidos, uma comparação entre os controles de qualidade dos métodos foi realizado. A **Tabela 4.24** apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 4.24:** Valores de concentração obtidos para os controles de qualidade dos métodos.

Gentamicina	QC 1 (mg/mL)			QC 2 (mg/mL)			QC 3 (mg/mL)		
	MC*	MG*	$\Delta$ (%)	MC*	MG*	$\Delta$ (%)	MC*	MG*	$\Delta$ (%)
C <sub>1a</sub>	0,013	0,021	<b>0,8</b>	0,058	0,068	<b>0,9</b>	0,133	0,130	<b>0,3</b>
C <sub>2</sub>	0,054	0,048	<b>0,6</b>	0,237	0,156	<b>8,1</b>	0,537	0,299	<b>23,8</b>
C <sub>2a</sub>	0,013	0,020	<b>0,7</b>	0,057	0,064	<b>0,7</b>	0,133	0,125	<b>0,8</b>
C <sub>1</sub>	0,026	0,035	<b>1,0</b>	0,112	0,117	<b>0,5</b>	0,259	0,233	<b>2,7</b>

\*MC – método de padronização externa utilizando a canamicina como padrão secundário.

\*MG – método de padronização externa utilizando a gentamicina.

De acordo com a maioria dos resultados obtidos, a diferença entre os valores apresentados é mínima (abaixo de 1%). Deste modo pode-se concluir que ambos os métodos desenvolvidos apresentam valores semelhantes podendo ser utilizados com segurança na quantificação dos componentes da gentamicina.

É importante destacar que o método proposto utilizando a gentamicina como padrão externo envolve compostos produzidos pelo mesmo fungo com estruturas e propriedades bastante semelhantes; cabe lembrar que essas propriedades são as responsáveis pela resposta apresentada pelo detector de ELSD. Ao contrário, a canamicina embora seja estruturalmente semelhante à gentamicina pode gerar uma resposta um pouco diferente, essa diferença quando aplicada a concentrações baixas pode implicar em um erro de medida maior.



#### **4.3.2.1.4 - APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A ANÁLISE DE GENTAMICINA**

O método utilizando a gentamicina como padrão externo foi aplicado para análise de um medicamento veterinário (Gentrin® - OuroFino), o qual foi avaliado em triplicata.

Considerando o valor do rótulo, duas amostras em diferentes concentrações (0,300 e 0,510 mg/mL) foram preparadas para análise. A precisão e exatidão obtidas não ultrapassaram os valores de 2 e 5% aceitos. Os resultados encontrados estão descritos na **Tabela 4.25**.

O resultado encontrado para o medicamento analisado (336 mg/mL) apresentou valores 2% acima da porcentagem aceita para o controle de qualidade de medicamentos veterinários, uma vez que as especificações do rótulo são de 300 mg de gentamicina total. Essa análise foi refeita e valores semelhantes foram novamente obtidos. Assim como para o método da estreptomicina, é importante destacar que a seletividade para a gentamicina no produto acabado não foi avaliada.

De acordo com o método desenvolvido é possível, além do controle de qualidade de gentamicina total, a determinação das concentrações de cada componente da gentamicina no medicamento avaliado.

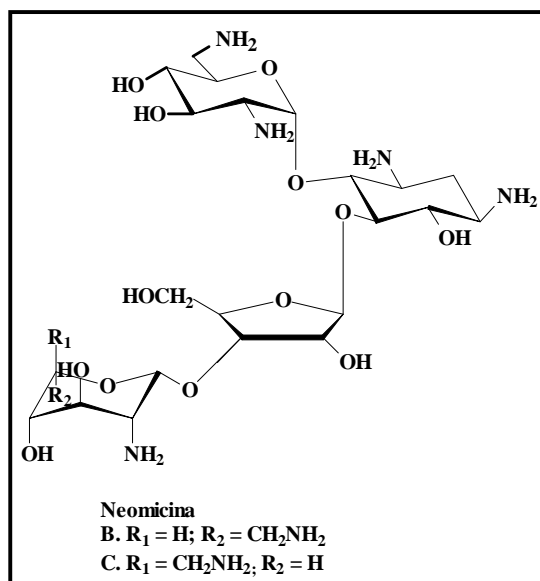
**Tabela 4.25:** Exatidão, precisão e concentração experimental obtida na análise em triplicata da gentamicina em medicamentos veterinários de acordo com o método desenvolvido.

Concentrações teóricas de gentamicina total (mg/mL)	Concentração encontrada de gentamicina total (mg/mL)	Concentração teórica das gentamicinas (mg/mL)	Concentração encontrada das gentamicinas (mg/mL)	CV (%) <sup>a</sup>		
0,300	0,348	C <sub>1a</sub>	0,070	C <sub>1a</sub>	0,075	0,50
		C <sub>2</sub>	0,071	C <sub>2</sub>	0,096	1,44
		C <sub>2a</sub>	0,068	C <sub>2a</sub>	0,073	1,62
		C <sub>1</sub>	0,091	C <sub>1</sub>	0,104	1,15
0,510	0,551	C <sub>1a</sub>	0,112	C <sub>1a</sub>	0,113	1,73
		C <sub>2</sub>	0,121	C <sub>2</sub>	0,153	1,34
		C <sub>2a</sub>	0,118	C <sub>2a</sub>	0,116	1,36
		C <sub>1</sub>	0,159	C <sub>1</sub>	0,169	0,48

<sup>a</sup> n = 3

### 4.3.3 – QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO NEOMICINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A neomicina (sulfato) também é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos efetivo contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa substância é composta por dois estereoisômeros majoritários denominados neomicina B (produto majoritário) e neomicina C (**Figura 4.62**).<sup>158</sup>



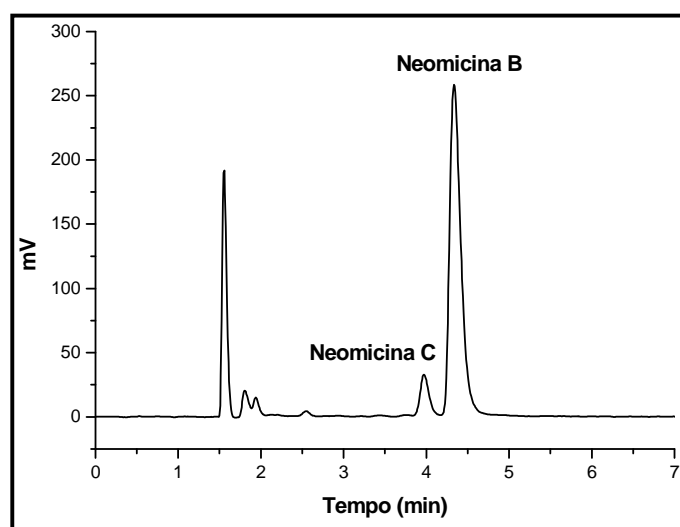
**Figura 4.62** – Estrutura química da neomicina.

Uma vez que a neomicina B e C são diastereoisômeros e levando em consideração o estudo realizado para a gentamicina, a resposta do ELSD é exatamente a mesma para as duas moléculas. Deste modo, um método simples, direto e sensível para a quantificação das neomicinas B e C foi desenvolvido utilizando um detector de espalhamento de luz (ELSD), levando em consideração a pureza do padrão utilizado e as proporções das respectivas áreas e concentrações de cada componente.

#### 4.3.3.1 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Embora boa seletividade entre os diastereoisômeros tenha sido obtida utilizando a fase móvel de 100% TFA 0,05M, visando ainda proporcionar uma proteção para a coluna utilizada, uma pequena porcentagem de metanol foi adicionada na fase móvel. A condição avaliada foi: TFA (0,05M)/CH<sub>3</sub>OH (99:01 v/v) e de acordo com os resultados obtidos, uma perda na resolução dos diastereoisômeros foi observada.

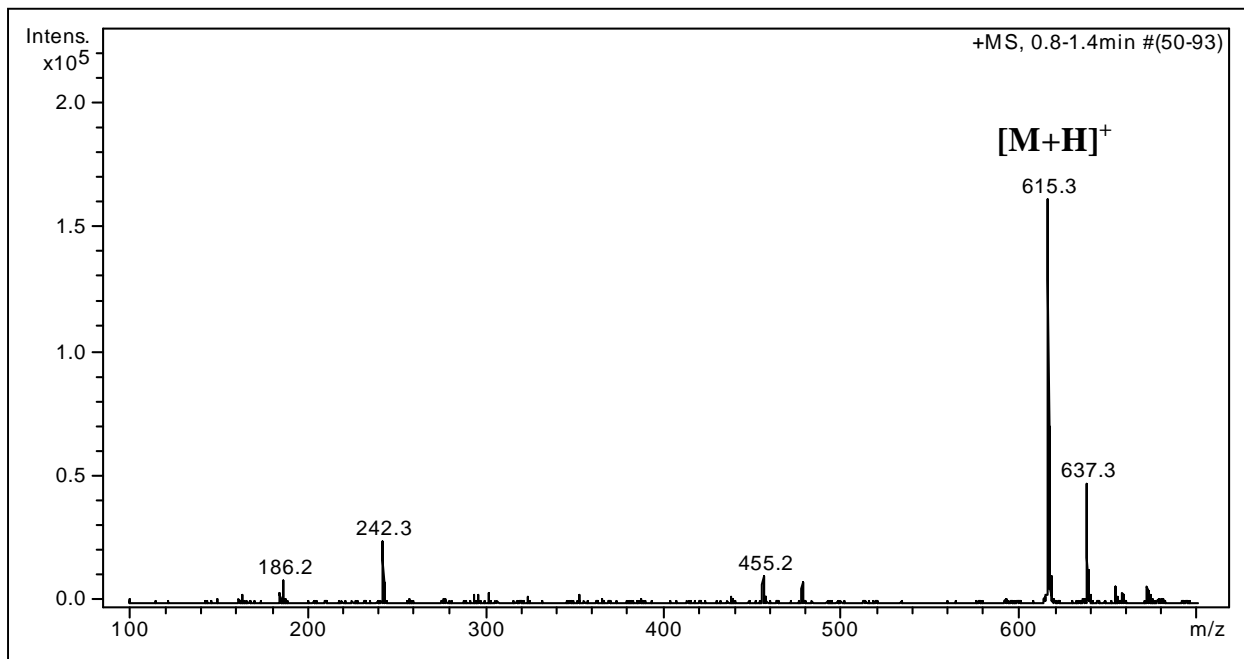
Considerando que no método desenvolvido para a quantificação da estreptomicina foi utilizada uma porcentagem alta de solução de TFA (0,05M) sem danos consideráveis a coluna cromatográfica, a condição selecionada para o desenvolvimento do método foi 100% de TFA (0,05M). A **Figura 4.63** mostra o cromatograma obtido utilizando a condição selecionada para análise.



**Figura 4.63** – Cromatograma de análise da neomicina utilizando a coluna  $C_{18}$  (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10  $\mu\text{m}$ ). Condições cromatográficas: TFA (0,05M). Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15  $\mu\text{L}$ . Condições do ELSD: Temperatura do tubo: 107,0  $^{\circ}\text{C}$ , Vazão do Gás (ar comprimido): 3,1 L/min, Ganho: 1 e Impacto: off.

A identificação das bandas cromatográficas, como dos epímeros da neomicina, foram feitas através de experimentos utilizando o LC-MS/MS.

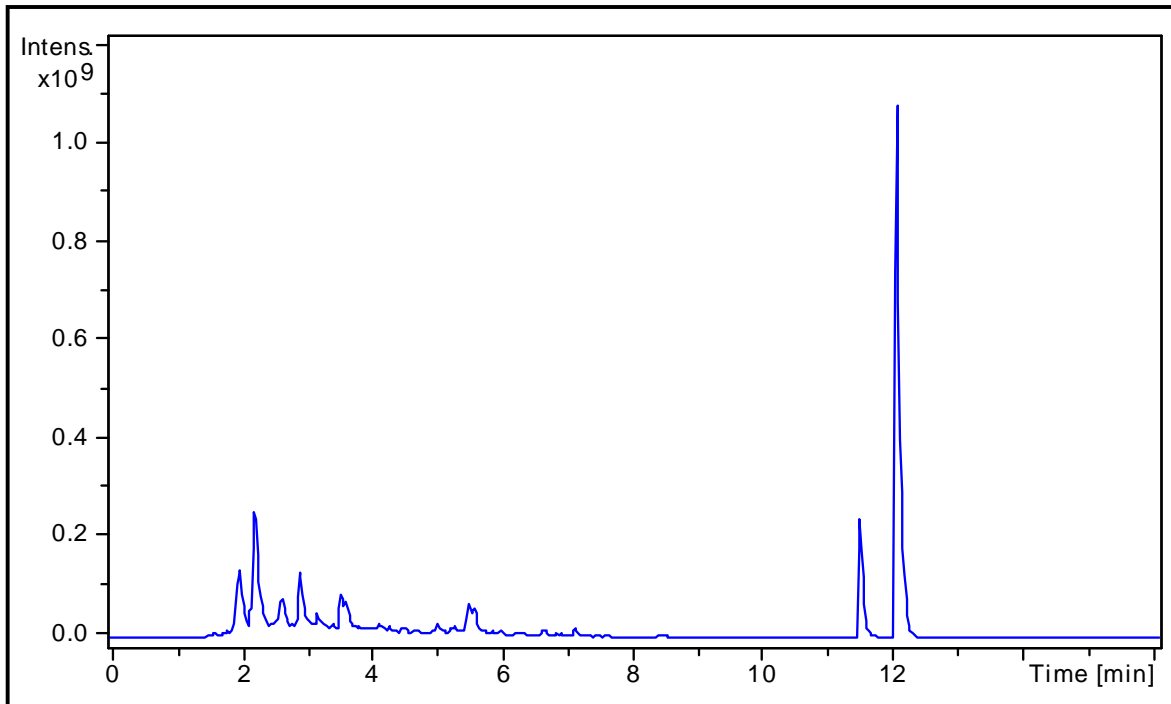
As condições ideais de ionização foram obtidas realizando-se inserção direta da amostra (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de neomicina) no espectrômetro de massa. A **Figura 4.64** mostra o espectro de massa obtido.



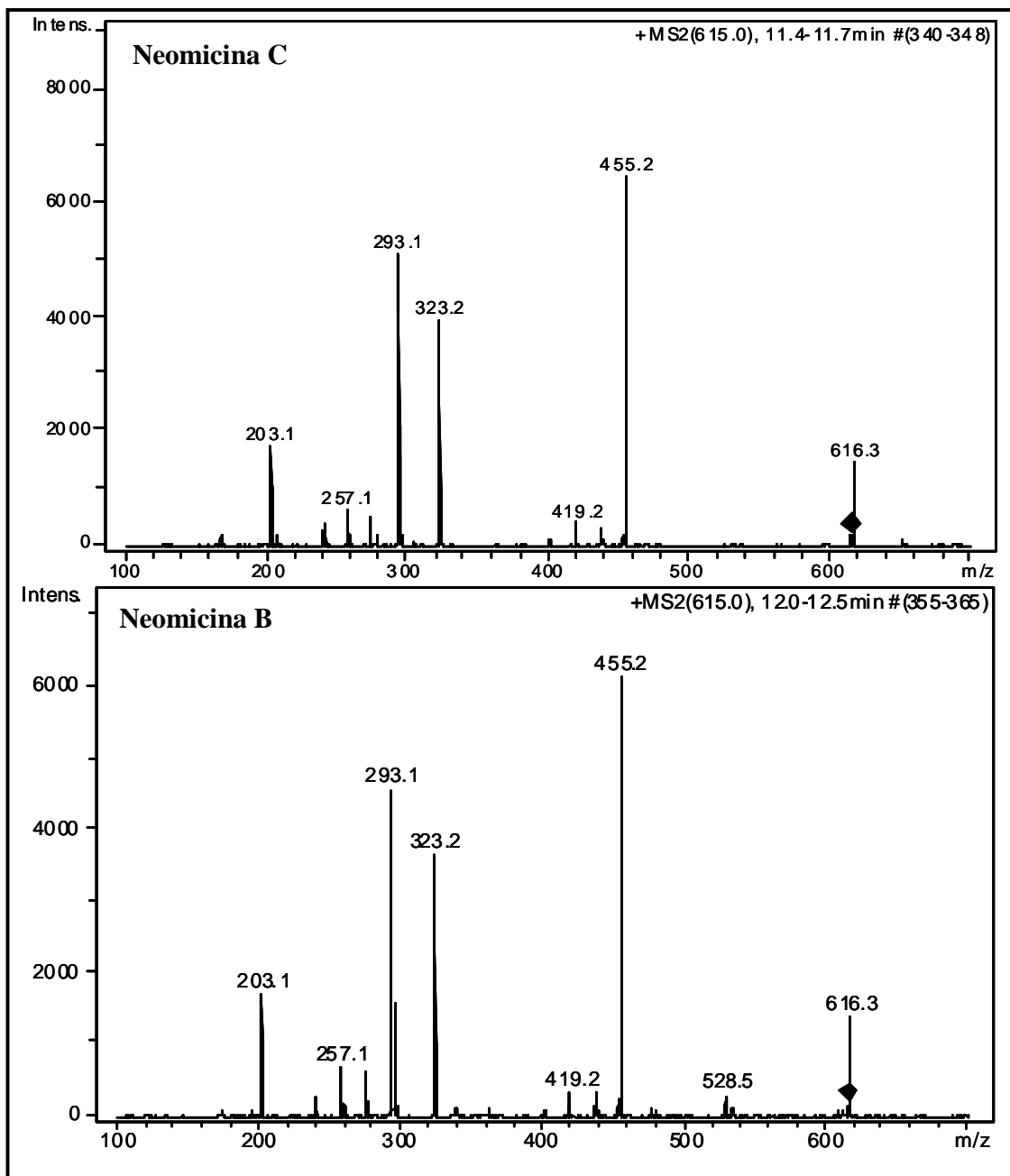
**Figura 4.64** – Espectro de massa da amostra de neomicina.

Experimentos de LC-MS/MS foram então realizados e a **Figura 4.65** mostra o cromatograma obtido para uma análise utilizando o experimento de SIM para a amostra. Foram observadas duas bandas cromatográficas com intensidades diferentes., assim como observado anteriormente utilizando o LC-ELSD.

Um experimento de *scan* foi também realizado e o espectro de íons fragmentos obtidos foram exatamente o mesmo indicando que as duas bandas cromatográficas possuem a mesma estrutura e conseqüentemente a mesma fragmentação. A **Figura 4.66** mostra os espectros obtidos de íons fragmentos.



**Figura 4.65** – Cromatograma de análise da neomicina utilizando a coluna C<sub>18</sub> (Hypersil 15 x 0,41 cm d.i.) (120 Å, 10 µm). Condições cromatográficas: TFA (0,05M). Vazão: 1,0 mL/min; Volume de injeção 15 µL. Condições do MS: Modo de análise: SIM; Analisador: Ion-trap.



**Figura 4.66** – Experimento de LC-MS de íons fragmentos.

Confirmada a separação cromatográfica dos diastereoisômeros, foi realizada a validação do método desenvolvido com a utilização de ELSD como detector.

Uma vez que a resposta do detector é proporcional a quantidade de amostra presente na cela <sup>29</sup> e a proporção de neomicina B é maior do que a

neomicina C <sup>158</sup>, a ordem de eluição determinada foi neomicina C (minoritária) como a banda de menor retenção e neomicina B (majoritária) com a de maior retenção.

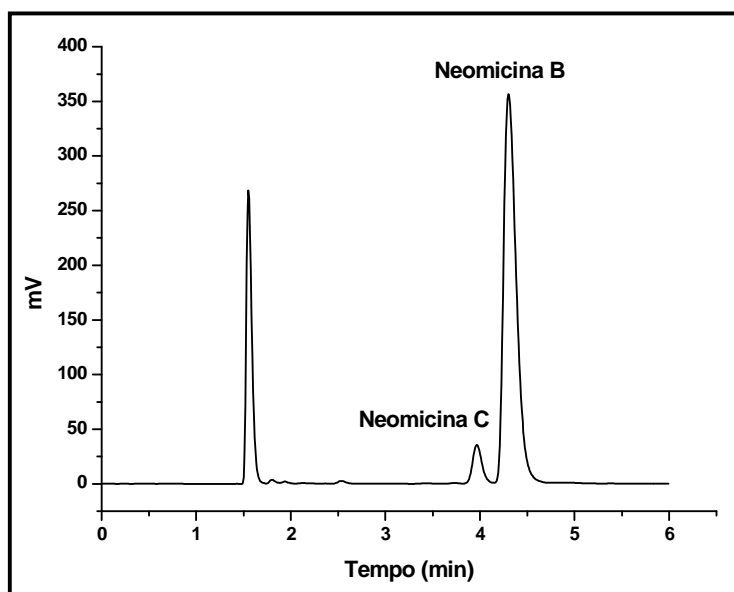
Com as condições cromatográficas estabelecidas, o método desenvolvido foi validado, consistindo da avaliação das figuras de mérito linearidade, precisão inter e intradia, exatidão e limites de quantificação e detecção.

A análise do antibiótico neomicina foi realizada utilizando-se a condição cromatográfica e parâmetros do detector descritos na **Tabela 4.26**, e a **Figura 4.67** apresenta o cromatograma obtido durante a validação do método.

**Tabela 4.26:** Valores otimizados do método LC-ELSD para a análise do antibiótico neomicina.

<b>Coluna</b>	C <sub>18</sub> Hypersil (15 x 0,46 cm d.i.) (120 Å, 10 µm)
<b>Fase Móvel</b>	TFA (0,05M)
<b>Vazão</b>	1,0 mL/min
<b>Tempo de Análise</b>	5 minutos
<b>Temperatura do Tubo</b>	107 °C
<b>Vazão do Gás (ar comprimido)</b>	3,1 L/min
<b>Ganho</b>	1
<b>Impactor</b>	Off



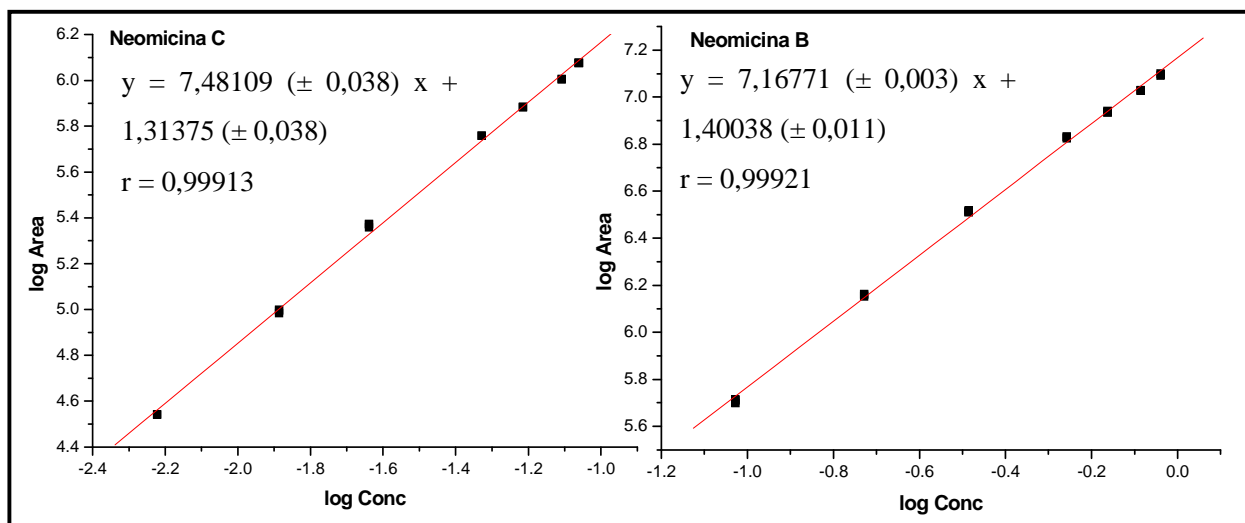


**Figura 4.67** – Cromatograma típico obtido da análise da neomicina na concentração de 0,35 mg/mL total, durante a validação do método.

Deste modo, levando em consideração o percentual de neomicina (64,6% de neomicina) especificado no padrão utilizado, as curvas de calibração para os epímeros da neomicina (**Figura 4.68**) foram obtidas em função das proporções das áreas das bandas cromatográficas relativas as seguintes concentrações de neomicina total: 0,100; 0,200; 0,350; 0,500; 0,600; 0,750; 0,900 e 1,00 mg/mL de acordo com a curva de calibração logarítmica  $\log A = b \log C_{\text{mg/mL}} + \log \alpha$ , sendo que para isso as amostras foram preparadas para cada concentração em triplicata em TFA 0,050M, e injetadas (15 $\mu$ L). As curvas mostraram-se linear nas faixas de concentração utilizadas (**Tabela 4.27**). O desvio padrão da regressão linear para o coeficiente angular foi de 0,030 e 0,011 para a Neomicina C e B, respectivamente. Para o coeficiente de correlação linear os valores obtidos foram de 0,038 e 0,003 para a Neomicina C e B, respectivamente.

**Tabela 4.27:** Concentrações dos epímeros da neomicina.

Neomicina	Concentrações (mg/mL)
C	0,006; 0,013; 0,023; 0,047; 0,061; 0,078 e 0,087
B	0,094; 0,187; 0,327; 0,553; 0,689; 0,822 e 0,913



**Figura 4.68** – Curvas de Calibração obtidas para as neomicinas C e B.

As precisões, expressas pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas, foram inferiores a 2% e as exatidões apresentaram um desvio menor que 15% do valor nominal de concentração em todas as concentrações para as duas curvas obtidas, exceto para os LQs, onde os desvios encontrados foram de 16%.

As precisões e exatidões, intra e interdias dos métodos, foram determinadas analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade (0,120; 0,400 e 0,800 mg/mL de neomicina total), em um mesmo dia e em dias não consecutivos, respectivamente. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi avaliada através da interpolação dos resultados na curva de calibração e expressa como percentagem de desvio entre as quantidades

adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações examinadas. Os resultados estão mostrados na **Tabela 4.28**.

**Tabela 4.28:** Exatidão (%) e precisão (%) intradia e interdia para a análise das neomicinas C e B.

C T <sup>a</sup> (mg/mL)	C P <sup>a</sup> (mg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)		
		Ex (%)	CV (%)	Ex (%)	CV (%)	Ex (%)	CV (%)	Ex (%)	CV (%)	
0.120	C	0,007	100	1,07	106	0,66	108	2,00	105	1,25
	B	0,113	98,8	1,54	101	1,54	101	1,90	100	1,66
0.400	C	0,035	85,7	1,95	88,8	0,12	88,4	1,62	87,6	1,23
	B	0,365	108	1,55	108	1,37	107	1,98	108	1,63
0.800	C	0,070	96,7	2,00	97,5	1,97	100	1,35	101	1,77
	B	0,730	101	0,60	101	0,82	101	1,26	101	0,89

<sup>a</sup> Concentração teórica

CT – Concentração total de neomicina

CP – Concentração proporcional de neomicina

Ex - Exatidão

A precisão apresentou para as replicatas das amostras CV de 0,60 a 2,00%, enquanto a exatidão valores de 85,7 a 108% das concentrações nominais. Todos os valores estão de acordo com os critérios de aceitação propostos pela ANVISA.<sup>157</sup>

A exatidão do método foi também avaliada pela análise de duas amostras de concentrações desconhecidas ao analista e chamado de teste cego. Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.29**.

Os valores obtidos para o limite de quantificação estão apresentados na **Tabela 4.30**. Os limites de detecção encontrados foram 25,0 µg/mL para a neomicina C e 7,0 µg/mL para a neomicina B.

**Tabela 4.29:** Precisão e exatidão obtidas para a neomicina no teste cego (n=3).

Neomicinas	Concentração adicionada (mg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Amostra 1	0,300 <sup>a</sup>		
C	0,020	0,59	95,1
B	0,280	1,92	95,2
Amostra 2	0,950 <sup>a</sup>		
C	0,084	1,90	93,5
B	0,866	1,99	94,0

<sup>a</sup>Concentração total de neomicina

**Tabela 4.30:** Limites de Quantificação para os componentes da neomicina.

Neomicina	LQ (mg/mL)
C	0,003
B	0,027

#### 4.3.3.2 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A ANÁLISE DE NEOMICINA

O método foi aplicado na análise, em triplicata, de dois diferentes medicamentos veterinários (Flumast® - Fort Dodge - e Ememats Plus® - Merial). Considerando o valor do rótulo, os dois medicamentos foram preparados na concentração de 0,70 mg/mL de neomicina total para análise.

Embora a seletividade para a neomicina também não tenha sido avaliada no produto acabado, a precisão obtida não ultrapassou o valor de 2 % aceito. Os resultados encontrados estão descritos na **Tabela 4.31**.

Os valores encontrados para os medicamentos analisados (21,1 mg/mL - Flumast® - e 18,7 mg/mL – Ememast Plus®) estavam em conformidade com as especificações dos rótulos (20 mg/mL de neomicina total).

Com esse método foi possível a determinação das concentrações de neomicina total e dos epímeros no medicamento avaliado utilizando como padrão externo a própria neomicina.

**Tabela 4.31:** Exatidão, precisão e concentração experimental obtida na análise em duplicata da neomicina em medicamentos veterinários de acordo com o método desenvolvido.

	Flumast®		Ememast Plus®)	
Concentração teórica de neomicina (mg/mL)	NeomicinaTotal	0,700	NeomicinaTotal	0,700
	C	0,024	C	0,051
	B	0,676	B	0,649
Concentração encontrada de neomicina (mg/mL)	NeomicinaTotal	0,738	NeomicinaTotal	0,655
	C	0,028	C	0,049
	B	0,710	B	0,606
Variação (%) <sup>a</sup>	C	0,11	C	1,26
	B	1,16	B	1,59

<sup>a</sup> n = 2

Todos os métodos desenvolvidos para a quantificação dos antibióticos aminoglicosídeos em medicamentos veterinários são rápidos (estreptomicina – 5 minutos; neomicina e gentamicina – 8 minutos de análise), diretos (não necessitam de derivação), de baixo custo; apresentaram linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade adequada e foram aplicados com sucesso na análise de medicamentos veterinários comercialmente disponíveis.

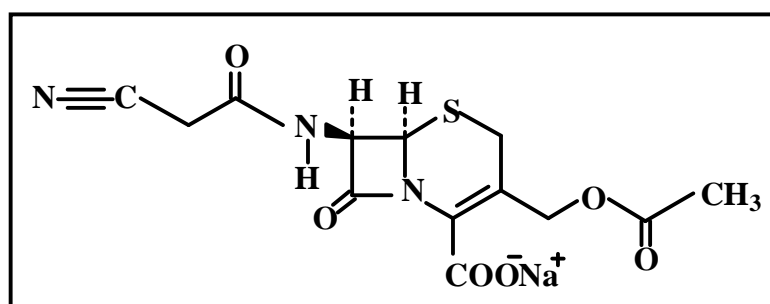
Considerando que os padrões utilizados, mesmo os primários, são sais de sulfato, a farmacopéia exige a quantificação deste íon. MEGOULAS e KOUPPARIS<sup>32, 35</sup> desenvolverem métodos cromatográficos para a quantificação do sulfato nos padrões utilizados para o desenvolvimento dos métodos de análises da gentamicina e neomicina e os resultados obtidos foram comparados com o método descrito pela farmacopéia e foram semelhantes entre si. Uma vez que um método cromatográfico para a quantificação de sulfato foi desenvolvido por MEGOULAS e KOUPPARIS<sup>32, 35</sup>, nos métodos desenvolvidos para a estreptomicina, neomicina e gentamicina não foram realizadas quantificação do sulfato, sendo considerado o valor apresentado nos certificados dos padrões utilizados.

#### **4.4 – DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR CLAE-MULTIDIMENSIONAL PARA ANÁLISE DE CEFACETRIL EM LEITE BOVINO UTILIZANDO O MS COMO DETECTOR**

Assim como os aminoglicosídeos, a classe de antibióticos pertencentes às  $\beta$ -lactamas, que incluem as penicilinas e cefalosporinas, está entre as mais amplamente utilizadas na medicina veterinária para o tratamento da mastite bovina. Os ensaios imunológicos e microbiológicos têm sido amplamente utilizados para a determinação de resíduos desses antibióticos em leite, o que torna necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, seletivos e sensíveis que possam ser usados rotineiramente.

Em nosso grupo de pesquisa, foi realizado um estudo envolvendo alguns compostos da classe das cefalosporinas para o desenvolvimento de métodos utilizando colunas RAM-BSA na análise de leite bovino<sup>56, 57, 115</sup>. Para dar continuidade a este estudo, o composto cefacetil (**Figura 4.69**) foi selecionado e a

otimização das condições cromatográficas para análise desse composto, por injeção direta de amostra, foi avaliado.



**Figura 4.69** – Estrutura química do Cefacetril.

De acordo com os resultados apresentados por OLIVEIRA <sup>115</sup>, a presença de um interferente no tempo de eluição do cefacetril, não permitiu o desenvolvimento de um método de análise por LC-UV multidimensional. Uma vez que não foi obtida a seletividade cromatográfica, o uso do espectrômetro de massas, como detector, foi considerado para dar continuidade ao estudo.

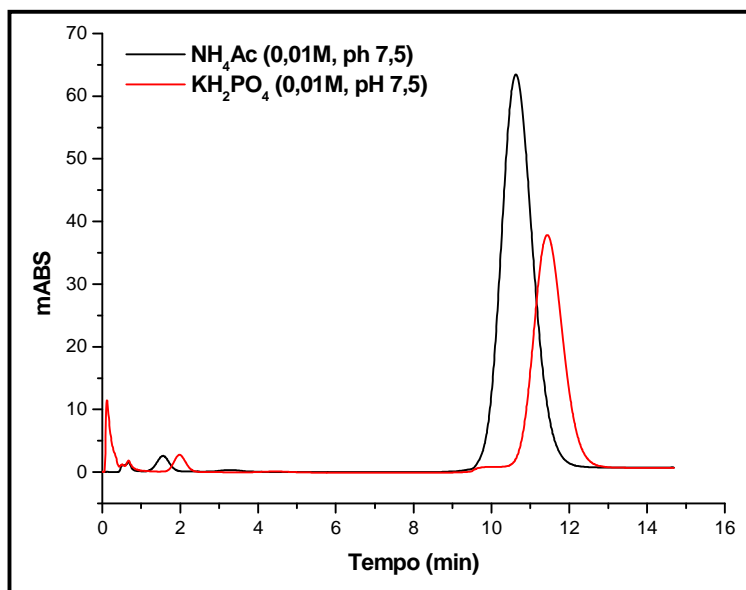
O espectrômetro de massas é um detector bastante sensível e seletivo, podendo ser operado em vários modos de análise fornecendo muitas informações sobre a amostra. Análises onde a co-eluição ocorre são possíveis, desde que a intensidade da banda cromatográfica obtida não seja afetada por outro analito. <sup>163 -</sup>

167

Deste modo, para dar continuidade ao método proposto foram realizadas análises utilizando solução acetato de amônio (0,01M, pH 7,5) para verificar alterações na retenção do analito na coluna RAM-BSA, já que a utilização da solução de fosfato não é possível no espectrômetro de massa devido à volatilidade. Esta análise foi realizada no detector de UV para uma comparação

com os resultados já obtidos por OLIVEIRA <sup>115</sup> utilizando solução fosfato de potássio.

A **Figura 4.70** mostra uma comparação entre fases móveis com as diferentes soluções avaliadas, onde nenhuma alteração significativa foi observada.



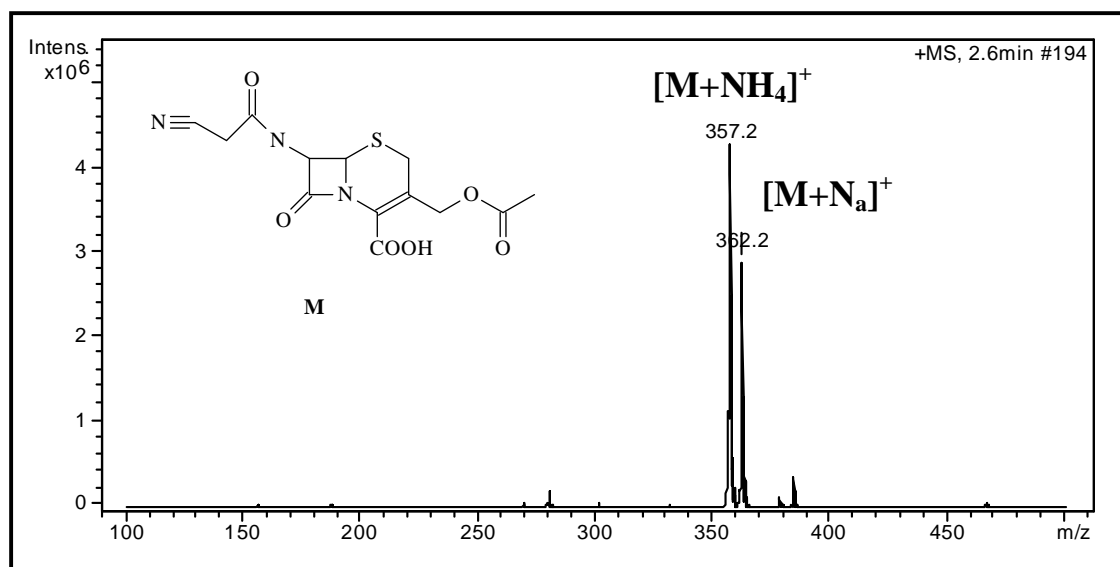
**Figura 4.70** – Cromatograma comparativo do cefacetil (50 µg/mL) utilizando a coluna C<sub>8</sub> – BSA (5 x 0,46 cm d.i) (120Å, 10µm). FM: NH<sub>4</sub>Ac (0,01M, pH 7,5) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01M, pH 7,5), Vazão: 1,0 mL/min, Volume de Injeção: 50 uL, λ = 270 nm.

Uma vez que as condições cromatográficas encontradas não tiveram que ser otimizadas, foi realizada a investigação dos parâmetros do espectrômetro de massas para melhor ionização do cefacetil. Essa investigação foi realizada utilizando ionização por ESI no modo positivo de análise, uma vez que o cefacetil apresenta em sua estrutura vários sítios para ionização no modo positivo.

As análises foram realizadas com uma solução de cefacetil (200 µg/mL) em acetato de amônio (0,01M, pH 7,5)/CH<sub>3</sub>CN (95:05). O solvente usado foi o mesmo da fase móvel de eluição da análise cromatográfica.



A **Figura 4.71** mostra o espectro de massas obtido com o ajuste dos parâmetros de ionização, onde adutos de sódio e amônio foram obtidos como íons mais estáveis no espectro.



**Figura 4.71** – Espectro de massas do cefacetril na fase móvel  $NH_4Ac$  (0,01M, pH 7,5)/ $CH_3CN$  (95:05).

As condições de ionização otimizadas para as análises estão apresentadas na **Tabela 4.32**.

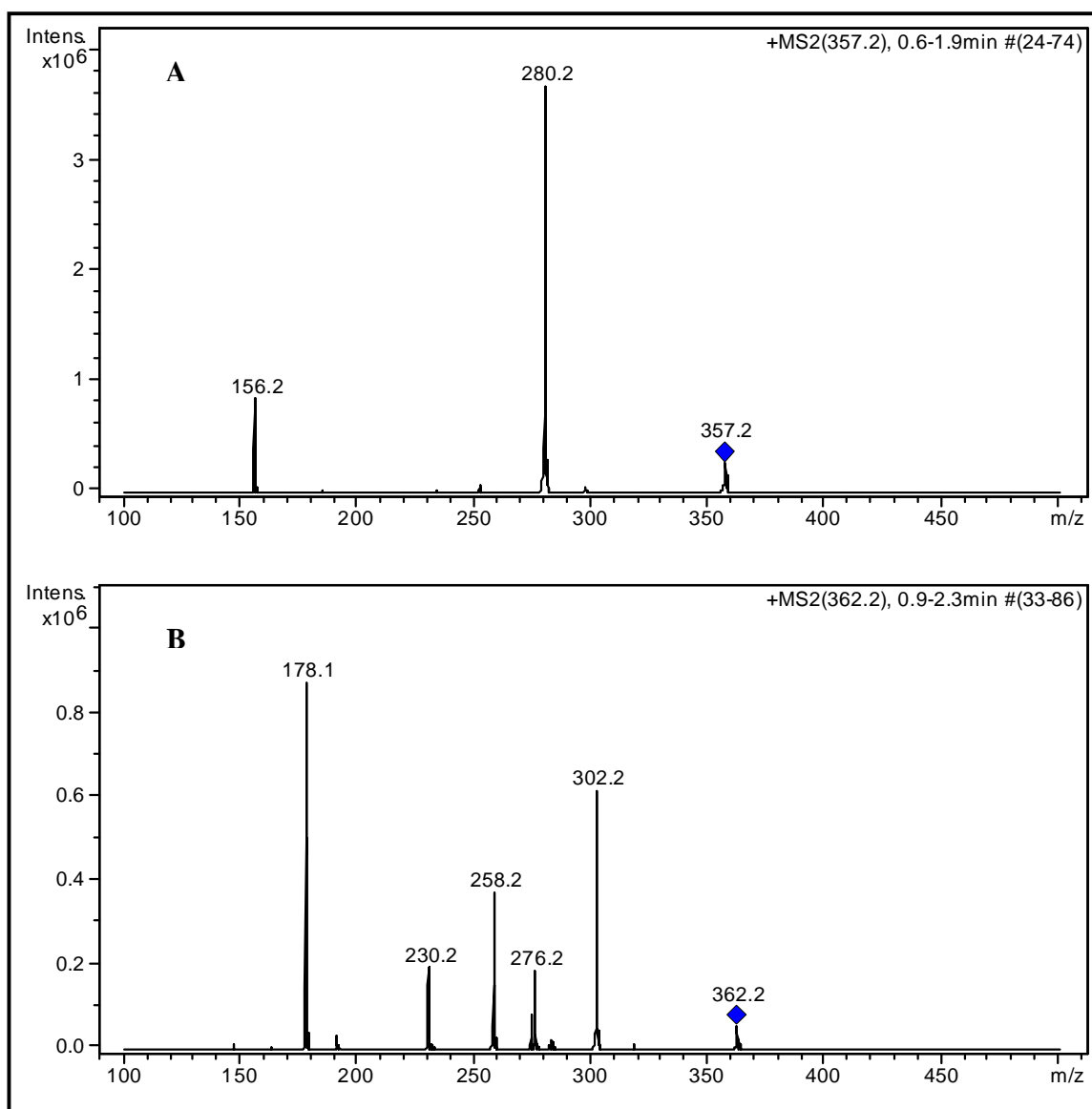
**Tabela 4.32:** Condições otimizadas no espectrômetro de massas (analisador tipo ion-trap) para a análise do cefacetril.

<b>Tune Source (ESI+)</b>	<b>Set</b>
Capillary Current Control	Off
Trap Drive	45,00
Skimmer	40V
Lens 1	-11V
Octapole RF amplitude	200,00Vpp
Partition	4,3V
Lens 2	-45,0V
Capillary exit	33,2V
Oct 1 D.C	7,0V
Oct 2 D.C	1,70V
HV end plate offset	-500V
Current end plate	1140,000nA
HV capillary	4000V
Current capillary	42,725nA
Dry temp	350°C
Dry gás	7,0L/min
Nebuliser	54,0psi
<b>Trap</b>	
Charge control	On
Accumulation time	5571 µs
ICC target	95000
Max accumulation time	200000 µs
Averages	7 spectra
<b>Vacuum System</b>	
Vacuum high	1,07 e <sup>-0,05</sup> mbar
Vacuum fore	3,25 e <sup>+000</sup> mbar

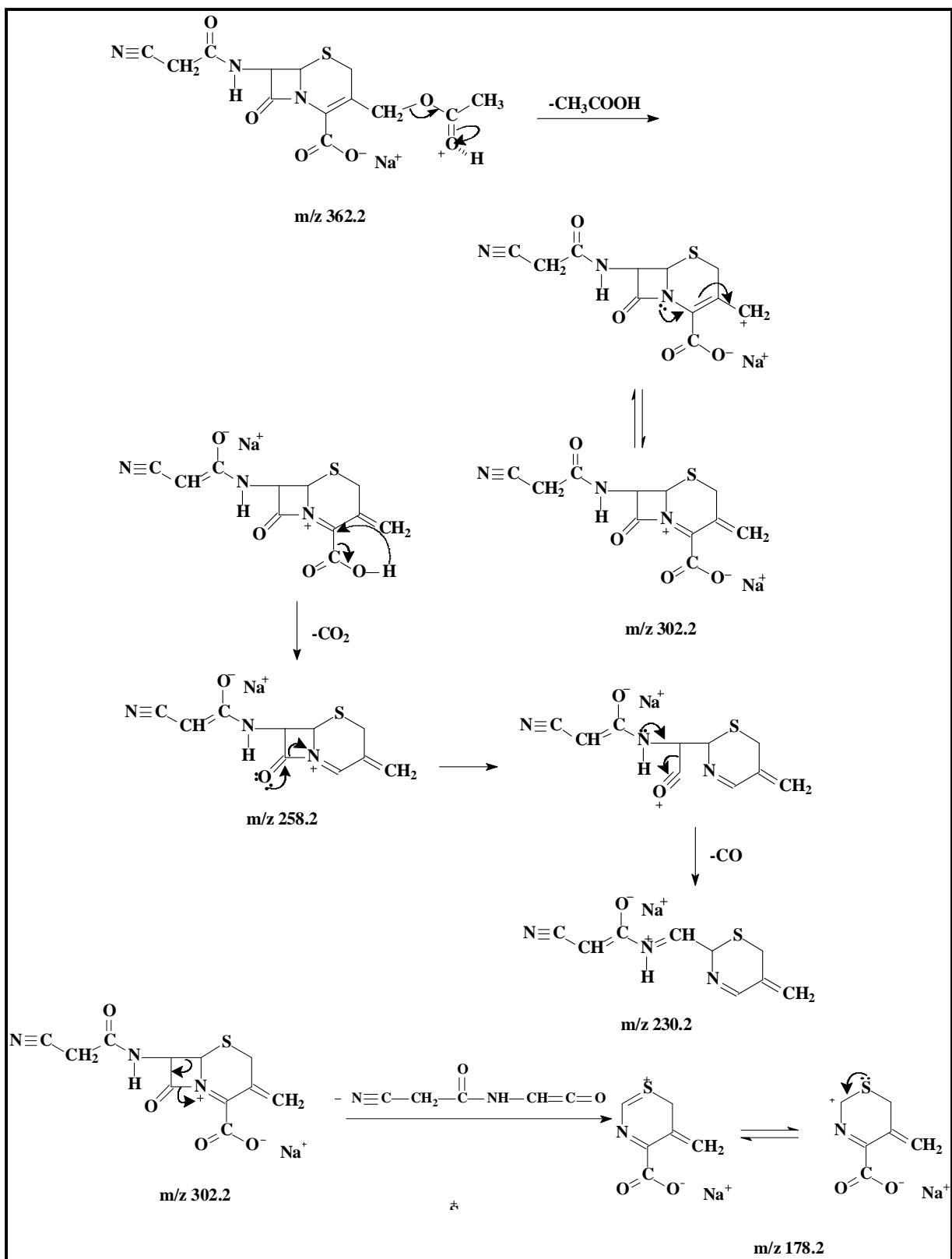
Para o desenvolvimento de métodos analíticos em cromatografia líquida utilizando-se o espectrômetro de massas como detector, é recomendável o monitoramento de no mínimo dois fragmentos característicos da amostra avaliada, garantindo alta seletividade<sup>160-162</sup>.

Deste modo, para a seleção dos fragmentos a serem monitorados um experimento de íons fragmentos foi realizado para os dois picos característicos do espectro obtido. A amplitude de fragmentação foi selecionada de modo que uma pequena porcentagem dos íons monitorados para fragmentação ( $m/z$  357,2 e 362,2) fosse observada no espectro. A **Figura 4.72** mostra os espectros obtidos e uma proposta de fragmentação é apresentada nas **Figura 4.73** e **4.74** para os adutos de sódio e amônio, respectivamente.

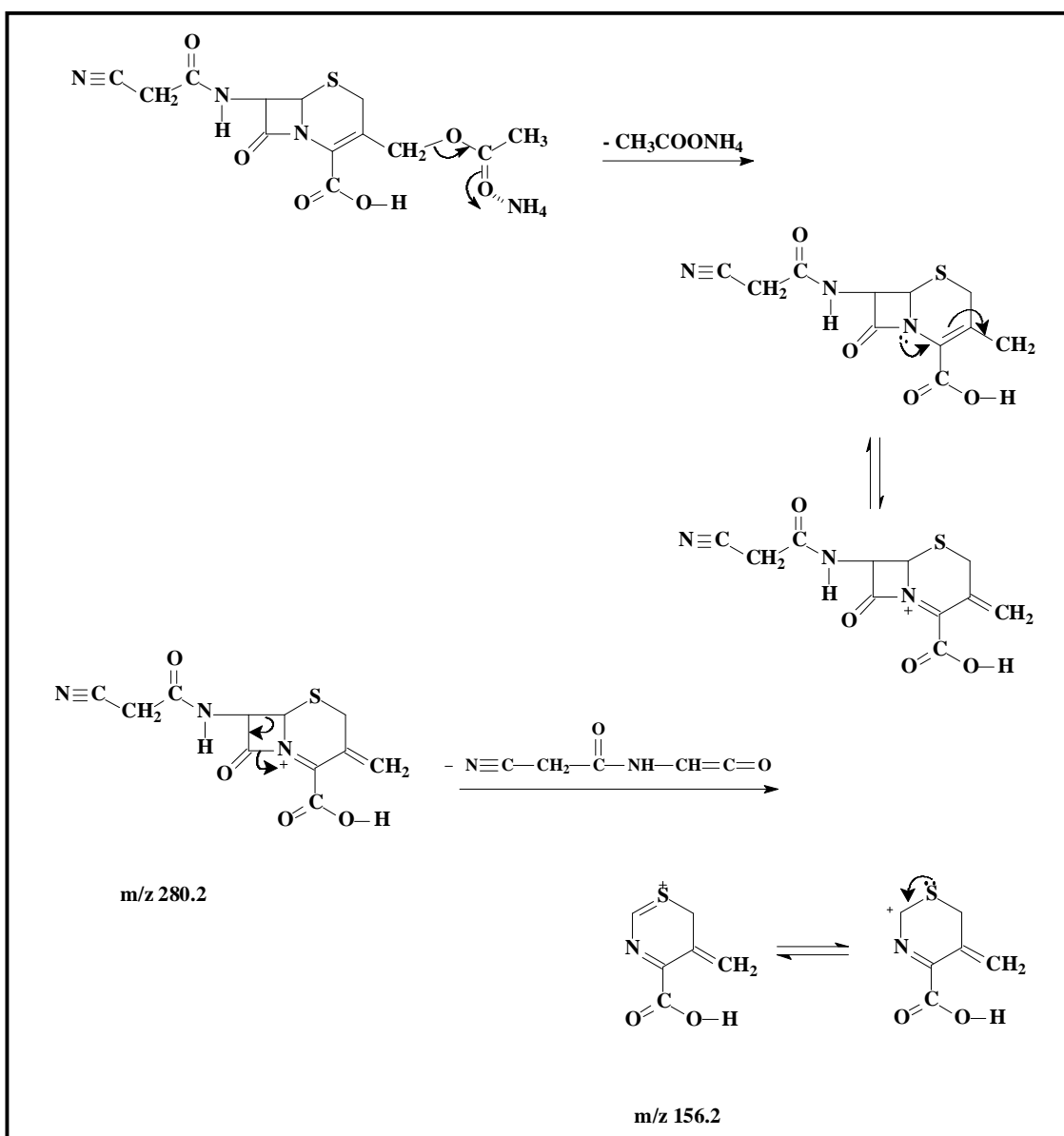
As transições selecionadas para o monitoramento no experimento de MRM foram  $m/z$  357,2  $\rightarrow$   $m/z$  280,2 e  $m/z$  362,2  $\rightarrow$   $m/z$  178,1, transições estas, correspondendo aos íons mais estáveis dos espectros.



**Figura 4.72** – Espectros de íons fragmentos dos íons  $m/z$  357,2 e 362,2 na fase móvel  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH 7,5)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (95:05). Amplitude de fragmentação: **A:** 0,20 e **B:** 0,25



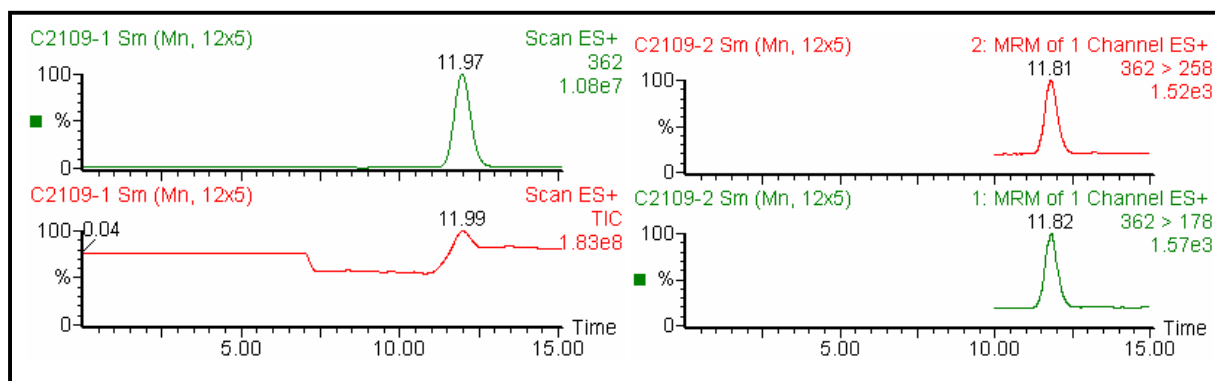
**Figura 4.73** – Proposta de fragmentação do aduto de sódio do cefacetril de acordo com o espectro de íons fragmentos obtidos.



**Figura 4.74** – Proposta de fragmentação do aduto de amônio do cefacetril de acordo com o espectro de íons fragmentos obtidos.

Otimizadas as condições do espectrômetro de massas para eficiente ionização do cefacetril, foi realizado o acoplamento do LC ao MS. Uma análise no modo “full scan” foi realizada e de acordo com os resultados obtidos uma banda cromatográfica bastante larga foi obtida em aproximadamente 13 minutos. Uma otimização da condição cromatográfica foi realizada, onde os cromatogramas obtidos (**Figura 4.75**) apresentaram simetria de banda cromatográfica e tempo de

análise adequado. É importante destacar que essa análise foi realizada em um equipamento do tipo triplo-quadrupolo, uma vez que o equipamento Íon-trap ainda não havia sido adquirido pelo nosso grupo de pesquisa.



**Figura 4.75** – Cromatogramas de análise do cefaclor (500 µg/mL) utilizando a coluna RAM-BSA C<sub>8</sub> (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10 µm). **A:** Full scan e **B:** MRM das transições  $m/z$  362 →  $m/z$  177 e  $m/z$  362 →  $m/z$  258. FM: NH<sub>4</sub>Ac (0,01M, pH 7,5) até 7 minutos e NH<sub>4</sub>Ac (0,01M, pH 7,5)/CH<sub>3</sub>CN (95:05). Condições para o MRM: Inter Channel Delay: 0,03 secs; Span: 1  $m/z$ ; Dwell Time 0,08 secs.

Utilizando o equipamento com analisador do tipo Ion-trap, uma solução 10 ng/mL de cefaclor foi preparada na fase móvel utilizada e na matriz e foram injetados 50 µL das amostras em triplicata para verificar a precisão (expressa pelo coeficiente de variação (CV) das triplicatas) da ionização da amostra. Os resultados obtidos apresentaram valores de CV acima de 20%, superior ao permitido pela ANVISA (15%)<sup>157</sup> para fluidos biológicos.

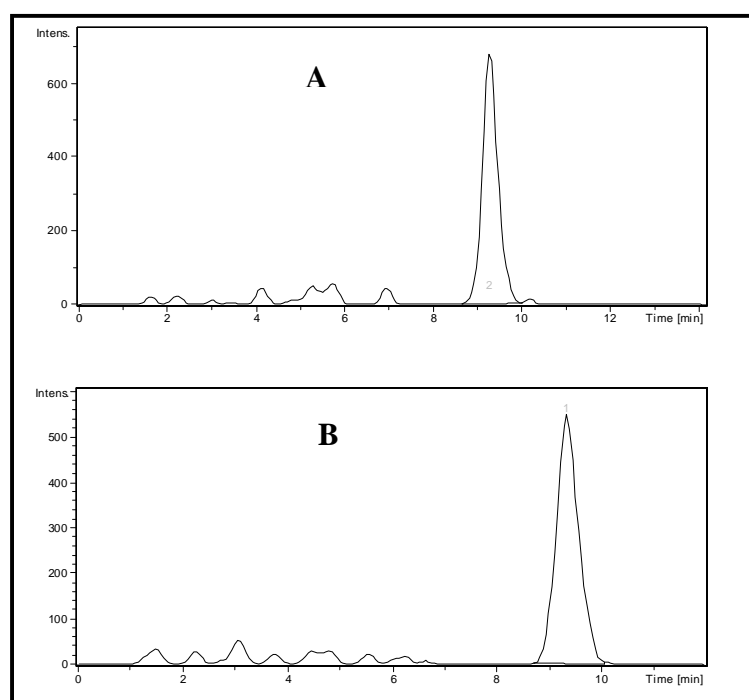
Uma solução mais concentrada de 40 ng/mL foi então avaliada. Nessas análises foram realizados o monitoramento de duas transições do íon de  $m/z$  362,2, uma vez que os parâmetros de ionização foram otimizados para obtê-lo como pico base no espectro.

As transições monitoradas foram  $m/z$  362,2 →  $m/z$  178,1,  $m/z$  362,2 →  $m/z$  302,2 e  $m/z$  357,2 →  $m/z$  280,2. Os resultados obtidos indicaram problemas

na ionização da amostra, de modo que em algumas análises não foram observadas bandas cromatográficas, e novamente o valor do CV foi maior do que o aceitável.

Deste modo então, novas condições de ionização foram determinadas para que o pico base no espectro da amostra fosse o  $[M+NH_4]^+$  e não mais  $[M+Na]^+$ . A **Tabela 4.33** mostra os novos valores de ionização otimizados.

Uma solução 40 ng/mL foi novamente preparada em solvente ( $NH_4Ac$  (0,01M, pH=7,5)/  $CH_3CN$  (95:05)) e na matriz e analisadas em triplicata. A **Figura 4.76** mostra os cromatogramas obtidos e a **Tabela 4.34** os coeficientes de variação calculados.



**Figura 4.76** – Cromatogramas de MRM de análise do cefacetil (40 ng/mL) utilizando a coluna RAM-BSA  $C_8$  (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10  $\mu$ m). Transição  $m/z$  357,2  $\rightarrow$   $m/z$  280,2 **A**: Solvente e **B**: Leite. **FM**:  $NH_4Ac$  (0,01M, pH= 7,5) até 7 minutos;  $NH_4Ac$  (0,01M, pH= 7,5)/ $CH_3CN$  (95:05 v/v) até 12 minutos. Amplitude de fragmentação: 0,20.



**Tabela 4.33:** Condições otimizadas no espectrômetro de massas (analisador tipo ion-trap) para a análise do cefacetril.

<b>Tune Source (ESI+)</b>	<b>Set</b>
Capillary Current Control	Off
Trap Drive	49,5
Skimmer	48V
Lens 1	-5V
Octapole RF amplitude	200,00Vpp
Partition	9,4V
Lens 2	-60,0V
Capillary exit	27,8V
Oct 1 D.C	12,0V
Oct 2 D.C	6,70V
HV end plate offset	-500V
Current end plate	1035,000nA
HV capillary	4000V
Current capillary	23,193nA
Dry temp	250°C
Dry gás	11,0L/min
Nebuliser	17,0psi
<b>Trap</b>	
Charge control	On
Accumulation time	45341 $\mu$ s
ICC target	10000
Max accumulation time	200000 $\mu$ s
Averages	7 spectra
<b>Vacuum System</b>	
Vacuum high	1,04 e <sup>-0,05</sup> mbar
Vacuum fore	3,34 e <sup>+000</sup> mbar

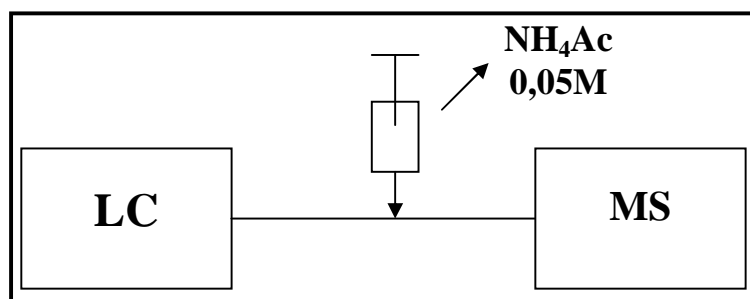
**Tabela 4.34:** Coeficientes de variação calculados para amostras em solventes e em leite analisadas em triplicata.

Cefacetil (40 ng/mL)	CV %
Solvente	33,2
Leite	2,60

De acordo com os resultados obtidos, o CV para as amostras em solventes está com um valor muito alto. Isso não era o esperado, uma vez que as injeções foram realizadas da mesma amostra, indicando problemas relacionados à ionização da amostra.

Foi preparada uma solução mais concentrada de 125 ng/mL, a qual é o limite máximo de resíduo permitido (LMR) para o cefacetil.<sup>4</sup> Os cromatogramas obtidos apresentaram bandas cromatográficas satisfatórias, mas, no entanto, apesar de uma melhora no valor obtido para as amostras preparadas em solvente, os coeficientes de variação novamente foram altos para análises realizadas da mesma amostra.

Considerando que a concentração de acetato de amônio no meio não estava sendo suficiente para garantir a eficiente ionização da amostra, uma solução 0,05M de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  foi infundida após o sistema cromatográfico, com o auxílio de uma bomba seringa. A **Figura 4.77** apresenta um esquema do sistema utilizado.



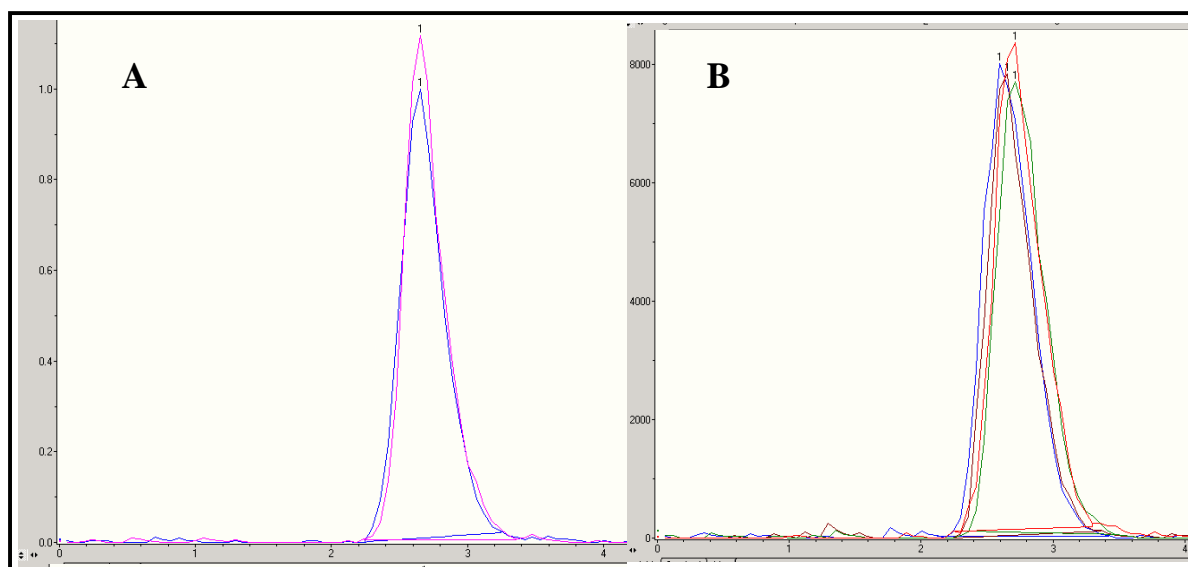
**Figura 4.77** – Sistema de infusão pós sistema cromatográfico da solução de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  0,05M.

De acordo com os resultados obtidos, os CV das replicatas das amostras analisadas continuou com valores altos, indicando que os problemas nas condições de ionização se mantinham. A **Figura 4.78** mostra os cromatogramas obtidos para o cefacetil no espectrômetro de massa.

Os valores do coeficiente de variação medidos foram em torno de 10% para as amostras preparadas em solvente e para as amostras preparadas na matriz.

Novamente foi realizada a infusão direta da amostra do cefacetil para verificação das condições de ionização utilizada e de acordo com os resultados obtidos as condições de ionização não foram reprodutíveis.

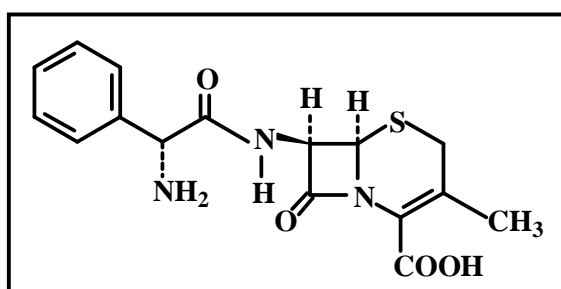
A inserção direta da amostra foi realizada em dias diferentes e foi verificada falta de reprodutibilidade da ionização do cefacetil mesmo com a infusão direta da amostra.



**Figura 4.78** – Cromatogramas de MRM de análise do cefacetil (50 ng/mL) utilizando a coluna RAM-BSA C<sub>8</sub> (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10 µm) – **A**: em solvente e **B**: em leite. Transição  $m/z$  357,2  $\rightarrow$   $m/z$  280,2. FM: NH<sub>4</sub>Ac (0,01M, pH= 7,5) até 7 minutos; NH<sub>4</sub>Ac (0,01M, pH= 7,5)/CH<sub>3</sub>CN (93:07 v/v) até 12 minutos. Amplitude de fragmentação: 0,20.

Para verificar se o problema era especificamente da molécula avaliada, uma vez que vários estudos de condições de ionização foram realizados e nenhuma condição otimizada foi eficiente para a formação de um íon estável do cefacetil; foi selecionado outro antibiótico da classe dos cefalosporínicos também bastante utilizado na medicina veterinária para o tratamento da mastite bovina para ser avaliado no desenvolvimento de um método por LC-MS multidimensional.

A **Figura 4.79** mostra a estrutura da cefalexina, uma molécula altamente hidrofílica, pouco solúvel em solventes orgânicos, como éter etílico, álcoois e clorofórmio.<sup>159</sup> Esse composto foi avaliado com sucesso em nosso grupo de pesquisa com injeção direta de amostras de leite por LC-UV multidimensional<sup>57,115</sup>

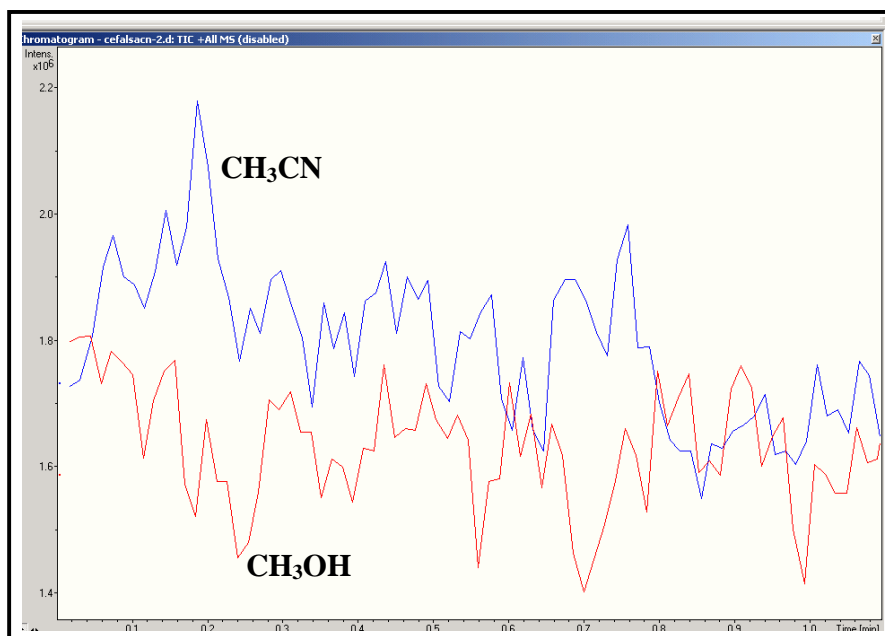


**Figura 4.79** – Estrutura química da cefalexina.

Primeiramente, para verificar a estabilidade do sinal gerado pelo MS, por inserção direta da amostra, foi realizado um estudo da intensidade da corrente iônica gerada para a cefalexina em solução  $\text{NH}_4\text{Ac}$  0,01M (pH=6,5), com a adição dos modificadores orgânicos  $\text{CH}_3\text{CN}$  e  $\text{CH}_3\text{OH}$  em proporções que representassem a mesma força de fase móvel a ser avaliada.

As fases móveis avaliadas foram  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10) e  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH=6,5)/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (87:13) nas fontes de ESI e APCI. De acordo com os resultados obtidos, os espectros de massa gerados na fonte de ESI foram melhores do que os espectros gerados utilizando a fonte de APCI, de modo

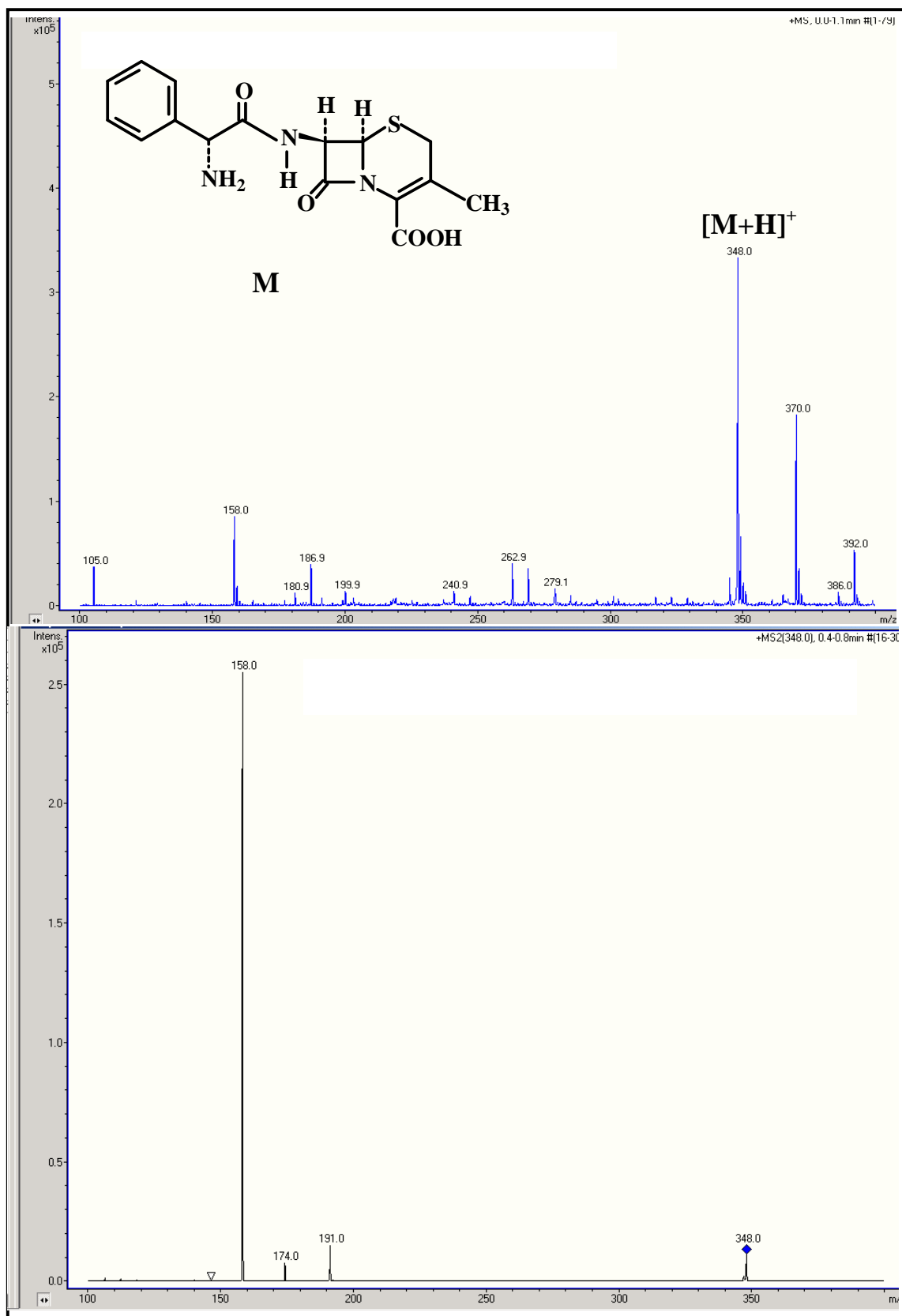
que a comparação da corrente iônica gerada utilizando os dois modificadores orgânicos diferentes foi realizada somente na fonte de ESI (**Figura 4.80**).



**Figura 4.80** – Cromatograma do íon extraído  $m/z$  348, para comparação da corrente iônica gerada para a cefalexina com a utilização de diferentes modificadores orgânicos.

Nas análises da cefalexina não foram observadas diferenças significantes na intensidade da corrente iônica gerada utilizando diferentes modificadores orgânicos. Do mesmo modo, a estabilidade do sinal observado foi adequada para a realização de experimentos de LC-MS utilizando as fases móveis avaliadas.

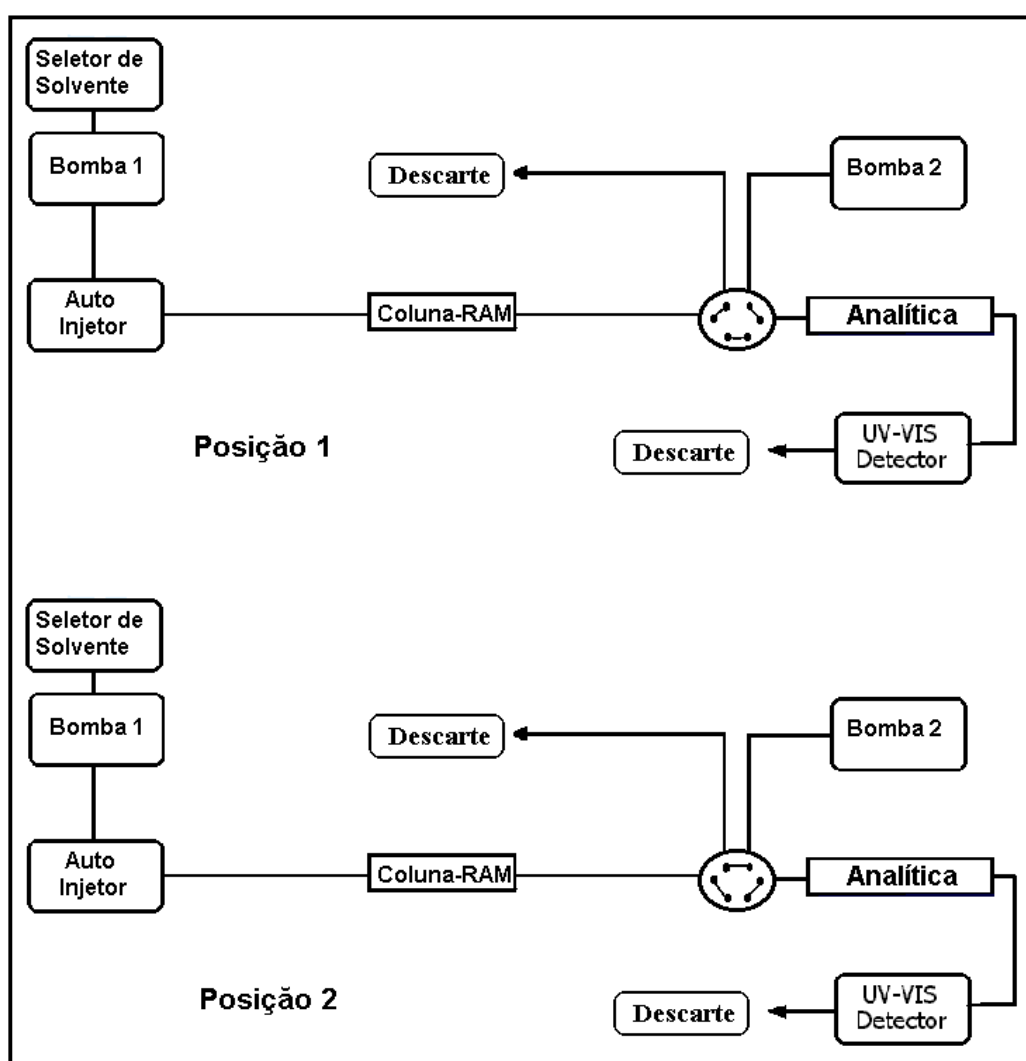
A **Figura 4.81** apresenta os espectros de massas obtidos para a molécula de cefalexina.



**Figura 4.81** – Espectro de massa e de íons fragmentos gerados para a cefalexina.

Foram preparadas soluções de cefalexina (100 ng/mL) em água para quantificação por LC/LC-MS/MS. As condições usadas foram as mesmas do trabalho já desenvolvido no grupo.<sup>115</sup>

Para a realização das análises foi utilizado um sistema cromatográfico multidimensional, através de uma válvula de seis caminhos, conforme mostrado na **Figura 4.82**.



**Figura 4.82** - Representação esquemática do sistema de cromatografia multidimensional utilizado.<sup>115</sup>

O sistema assim constituído apresenta algumas características importantes:

(a) A válvula FCV-10AL ligada à bomba (1) permite a eluição de diferentes fases móveis na coluna extratora;

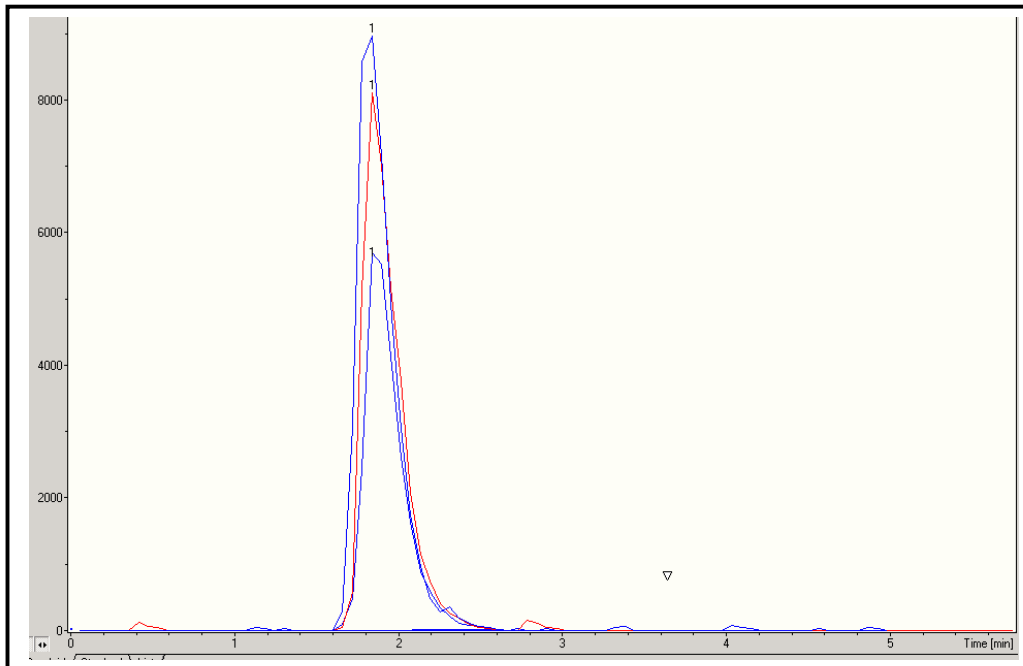
(b) O sistema na posição 1 permite a remoção das macromoléculas do leite e retenção do antibiótico na coluna RAM-BSA. Na posição 2 permite a transferência somente do antibiótico para a coluna analítica e, após a transferência, várias modificações podem ser realizadas para se obter a seletividade desejada.

(c) As colunas podem ser eluídas e condicionadas separadamente. Desta forma, durante a remoção das macromoléculas do leite e extração dos analitos pela coluna extratora usando as fases móveis da bomba (1), a coluna analítica é condicionada pela fase móvel eluída da bomba (2). Por outro lado, durante a análise do antibiótico na coluna analítica, a coluna extratora está sendo limpa e condicionada para a próxima injeção.

As condições cromatográficas avaliadas foram: fase móvel  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01 M, pH 6,5) /  $\text{CH}_3\text{CN}$  (95:05) durante 5 minutos para a exclusão protéica e de interferentes e  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01 M, pH 6,5) /  $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10) para transferência da banda cromatográfica da coluna extratora RAM-BSA  $\text{C}_8$  para a coluna analítica  $\text{C}_{18}$ -Hypersil. A mesma fase móvel utilizada para a transferência do analito, foi utilizada para sua análise na coluna analítica.

A **Figura 4.83** mostra os cromatogramas obtidos e de acordo com os resultados, um novo problema de precisão foi verificado entre as análises realizadas.





**Figura 4.83** – Cromatograma de análise de uma amostra de cefalexina 100 ng/mL em solvente.

De acordo com os cromatogramas pode-se verificar um aumento das áreas obtidas na seqüência da primeira para a última injeção realizada. Assim, foi desenvolvido um estudo detalhado dos parâmetros “target“ e “max accumulation time”, uma vez que esses parâmetros são os responsáveis pela quantidade de íons aprisionados no trap e o tempo de aprisionamento dos mesmos.

De acordo com esses parâmetros, se os valores realmente não estiverem bem estabelecidos a quantidade de íons aprisionados e o tempo que esses permanecem no trap poderiam causar o efeito observado nas análises, de aumento da área da banda de acordo com as injeções.

Foram avaliados 6 conjuntos de valores e estes estão listados na **Tabela 4.35**.

**Tabela 4.35:** Valores de “target” e “max accum. time” avaliados para a cefalexina.

target	max. accum. time
20000	200
2000	70
2000	20
2000	5
2000	10
15000	10
1000	5

Foram realizadas análises em triplicata para cada conjunto de parâmetro e as áreas medidas foram avaliadas. O conjunto de valores de “target” 1000 e “max accum time” 5 foi o que apresentou melhores resultados, embora o coeficiente de variação entre as análises ainda tenha sido fora dos valores aceitos pela ANVISA<sup>157</sup> (15%).

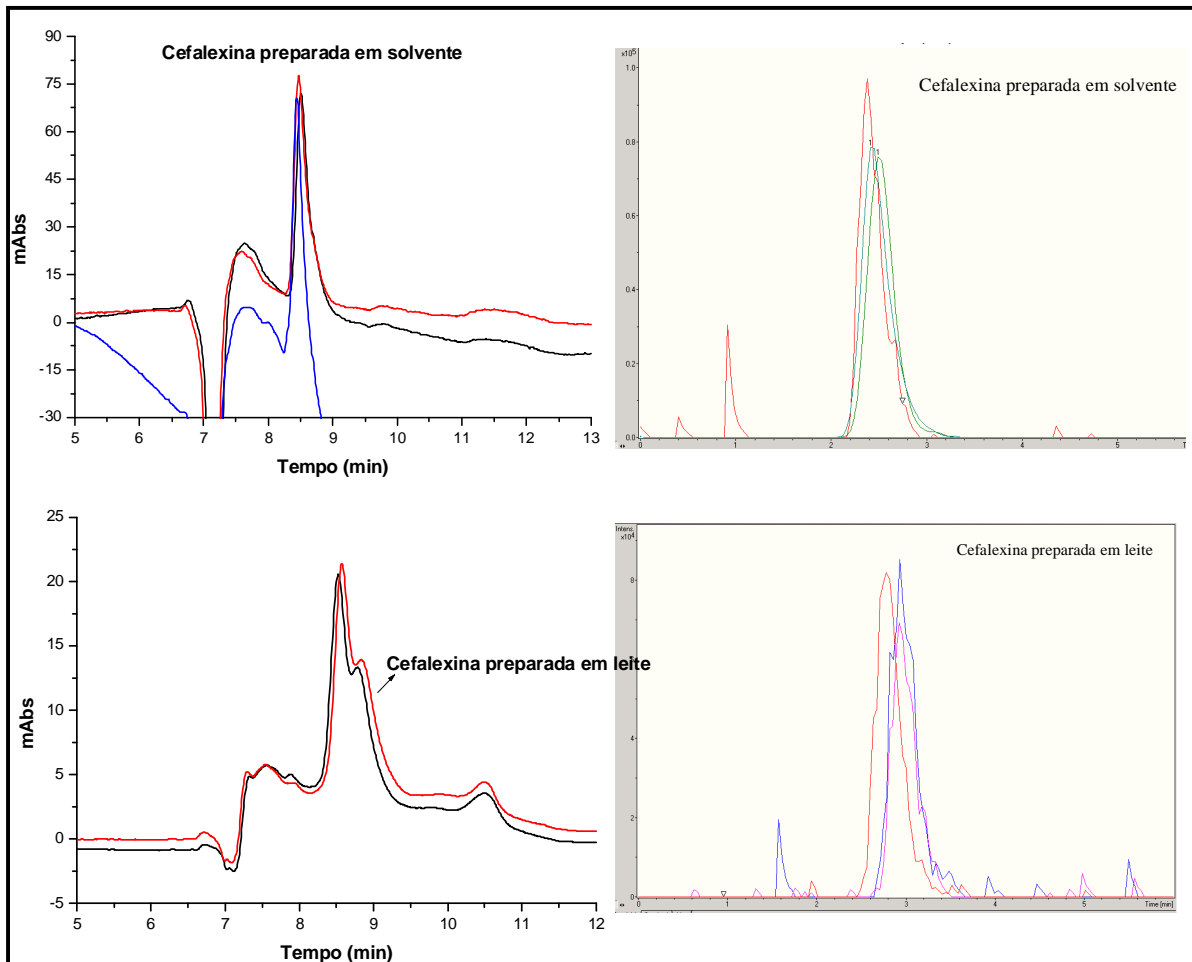
Em se tratando de um composto facilmente ionizável, seria de se esperar que isso facilitasse a detecção por MS, no entanto, essa propriedade, pode acarretar em falta de precisão de retenção cromatográfica. Isso foi observado, quando da quantificação da cefalexina usando o UV como detector. Portanto, o uso do agente de pareamento catiônico dihidrogênio fosfato de tetrabutylamônio (HTBA) foi também considerado.

Baseado em trabalho desenvolvido no grupo para a análise de amoxicilina em plasma humano<sup>148</sup>, o HTBA foi adicionado na amostra e não na fase móvel como comumente é utilizado.

A concentração de HTBA avaliada foi de 2,0 mM, correspondente a proporção de ordem de  $10^6$  moléculas do agente de pareamento iônico em relação

ao número de moléculas de cefalexina presentes na concentração avaliada (20 ng/mL).

Essa avaliação do controle da ionização da amostra foi monitorada pela resposta dos detectores de UV e MS. A **Figura 4.84** mostra os resultados obtidos pelos dois detectores para as amostras avaliadas.



**Figura 4.84** – Cromatogramas de análise da cefalexina preparada em solvente e em leite com uso do agente de pareamento iônico HTBA, monitorados com os detectores de UV e MS.

De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que ainda há uma diferença de intensidade entre as bandas cromatográficas obtidas com o MS.

Esse comportamento mais uma vez pode ser atribuído a falta de um melhor controle da ionização da molécula.

Uma vez que a fase móvel utilizada faz uso de um meio tamponado ( $\text{NH}_4\text{Ac}$  0,01M, pH 6,5), e também foi realizada a adição de um agente de pareamento iônico (HTBA) na amostra, um último parâmetro que poderia auxiliar no controle da ionização da cefalexina seria o controle da temperatura utilizada na coluna cromatográfica.

Deste modo foi avaliada a temperatura de 35 °C para ambas as colunas cromatográficas utilizadas (RAM-BSA  $\text{C}_8$  e analítica  $\text{C}_{18}$ ). Os resultados obtidos não mostraram uma melhora significativa na repetibilidade dos tempos de retenção, no entanto, o uso da temperatura de 35 °C foi mantido.

Outro fator levado em consideração foi o volume morto causado pela válvula de 6 caminhos empregada no acoplamento das duas colunas cromatográficas utilizadas. A fase móvel avaliada para a extração da cefalexina da coluna extratora após a exclusão protéica ( $\text{NH}_4\text{Ac}$  (0,01M, pH 7,5)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10)), proporcionava a extração do composto logo após o acoplamento das duas colunas, de modo que o tempo de retenção poderia causar alterações.

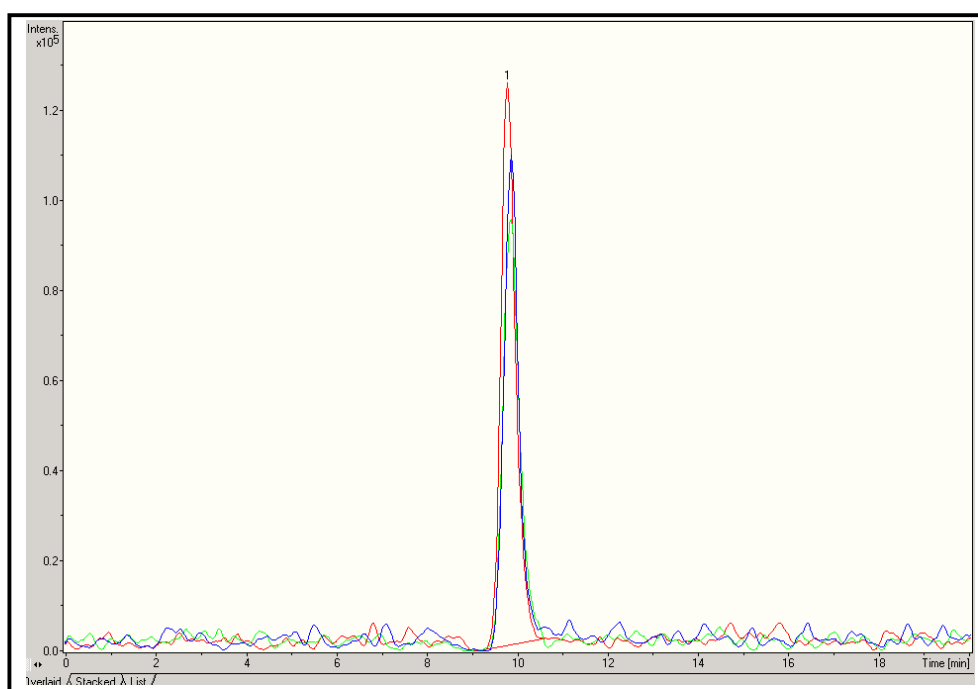
Foi realizada então alterações na força da fase móvel, de modo que a porcentagem de acetonitrila (5%) utilizada na fase móvel de exclusão proteína foi removida, aumentando a retenção da cefalexina.

Os resultados obtidos mostraram que o hifenamento LC/LC-MS/MS continuou a apresentar problemas de precisão, uma vez que as áreas das bandas cromatográficas obtidas apresentaram uma dispersão muito grande de valores (**Figura 4.85**).

É importante ressaltar que o desenvolvimento de um método cromatográfico com detecção por MS para essa classe de antibióticos exige o uso de artifícios para controlar a ionização do analito em solução<sup>56</sup> e ao mesmo tempo

uma eficiente ionização é necessária para que a detecção por MS seja alcançada com sucesso.

Deste modo, assim como para o cefacetil, não foi possível o desenvolvimento de um método por injeção direta de amostra para análise de cefalexina em leite bovino com detecção por MS.



**Figura 4.85** – Cromatogramas de análise da cefalexina (100 µg/mL) em leite utilizando a coluna C<sub>18</sub> – BSA (5 x 0,46 cm d.i) (120Å, 10µm) e C<sub>18</sub>-Hypersil (5 x 0,46 cm d.i.) (120Å, 10µm), com detecção por MS. Condições cromatográficas: Linha (A): NH<sub>4</sub>Ac 0,01 mol/L (pH 7,5) – 5 minutos para exclusão protéica; Linha (B): NH<sub>4</sub>Ac 0,01 mol/L (pH 7,5): CH<sub>3</sub>CN (90:10 v/v) para transferência e análise da cefalexina na coluna analítica; e Linha (C): NH<sub>4</sub>Ac 0,01 mol/L (pH 7,5): CH<sub>3</sub>CN (50:50 v/v) para limpeza da coluna RAM-BSA.

## 4.5 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ENANTIOSELETIVO POR INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ALBENDAZOL POR LC-MS-MS

### 4.5.1 – DESENVOLVIMENTO

Considerando os problemas verificados nos estudos dos antibióticos cefalosporínicos e também levando em consideração as condições utilizadas para análise dos metabólitos do albendazol em plasma bovino <sup>122</sup>, foi feita uma otimização das condições cromatográficas para obtenção de uma eficiente exclusão das proteínas do leite, extração dos metabólitos e enantioresolução para o albendazol sulfóxido, sem o uso de soluções tamponadas.

Foi usada solução fosfato de potássio dibásico como fase móvel, para exclusão das proteínas do plasma bovino, no trabalho desenvolvido por BELAZ <sup>122</sup>. Sabendo, que água pode ser usada de modo eficiente para exclusão de proteínas do leite, foram avaliadas misturas de água e acetonitrila como fase móvel. De acordo com os resultados obtidos, não foi observada nenhuma diferença significativa para a exclusão das macromoléculas e extração dos metabólitos. Nenhuma perda de resolução entre os metabólitos foi observada, de modo que o desenvolvimento de um método em leite sem o uso de solução tampão foi realizado. A **Tabela 4.36** apresenta as condições cromatográficas otimizadas. O mesmo sistema multidimensional apresentado na **Figura 4.82** foi utilizado nesse estudo, com o emprego de uma coluna quiral como coluna analítica.

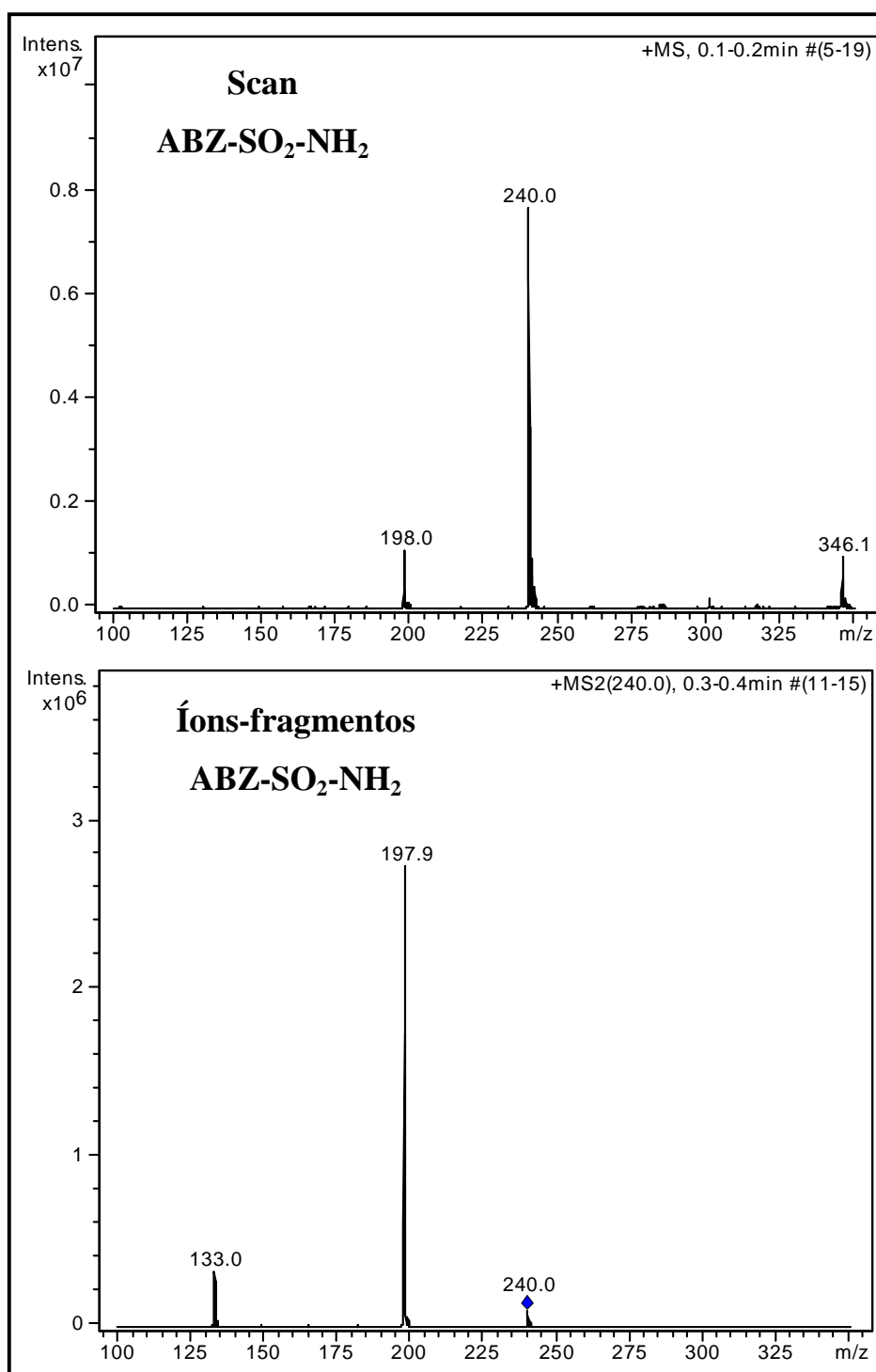
Para otimização das condições de ionização no MS, os compostos foram preparados e analisados separadamente na concentração de 500 ng/mL na fase móvel utilizada na coluna quiral (água/CH<sub>3</sub>CN, 50:50).

A **Figura 4.86** mostra os espectros de massa obtidos com o ajuste dos parâmetros de ionização, assim como os espectros de íons fragmentos obtidos com amplitude de fragmentação de 0,35 para todos os íons. As transições selecionadas para monitoramento de cada composto estão listadas na **Tabela 4.37** e as **Tabelas 4.38; 4.39** e **4.40** apresentam os parâmetros de ionização otimizados para cada composto.

**Tabela 4.36:** Condições cromatográficas utilizadas, no sistema multidimensional, para a exclusão das macromoléculas e eluição dos analitos na coluna RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e para a análise dos metabólitos do albendazol na coluna quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.).

<b>Tempo (min)</b>	<b>Evento</b>
<b>BOMBA 1</b>	
0,00 - 5,00	FM: 100% água [exclusão das proteínas pela coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.)]; vazão de 1,0 mL/min
5,01–7,30	FM: água:CH <sub>3</sub> CN (60:40) (extração dos compostos da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA); vazão de 1,0 mL/min
6,30–7,30	FM: água: CH <sub>3</sub> CN (60:40) [transferência dos compostos da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA para a coluna analítica]; vazão de 1,0 mL/min
7,31–12,30	FM: CH <sub>3</sub> CN:água:ISO (75:15:10) (limpeza da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA); vazão de 1,0 mL/min
12,31-20,00	FM: 100% água (condicionamento da coluna RAM-C <sub>8</sub> -BSA); vazão de 1,0 mL/min
<b>BOMBA 2</b>	
0,00–6,30	FM: água:CH <sub>3</sub> CN (50:50) [condicionamento da coluna analítica tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15 x 0,46 cm d.i.)]; vazão de 0,8 mL/min
6,30–7,30	FM: água:CH <sub>3</sub> CN (50:50) (transferência dos compostos da coluna extratora para a coluna analítica); vazão de 0,8 mL/min
7,30–20,00	FM: água:CH <sub>3</sub> CN (50:50) (análise do ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> , ABZ-SO <sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO)





**Figura 4.86** – Espectros de massa e de íons fragmentos dos metabólitos ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub> e (±)-ABZ-SO.

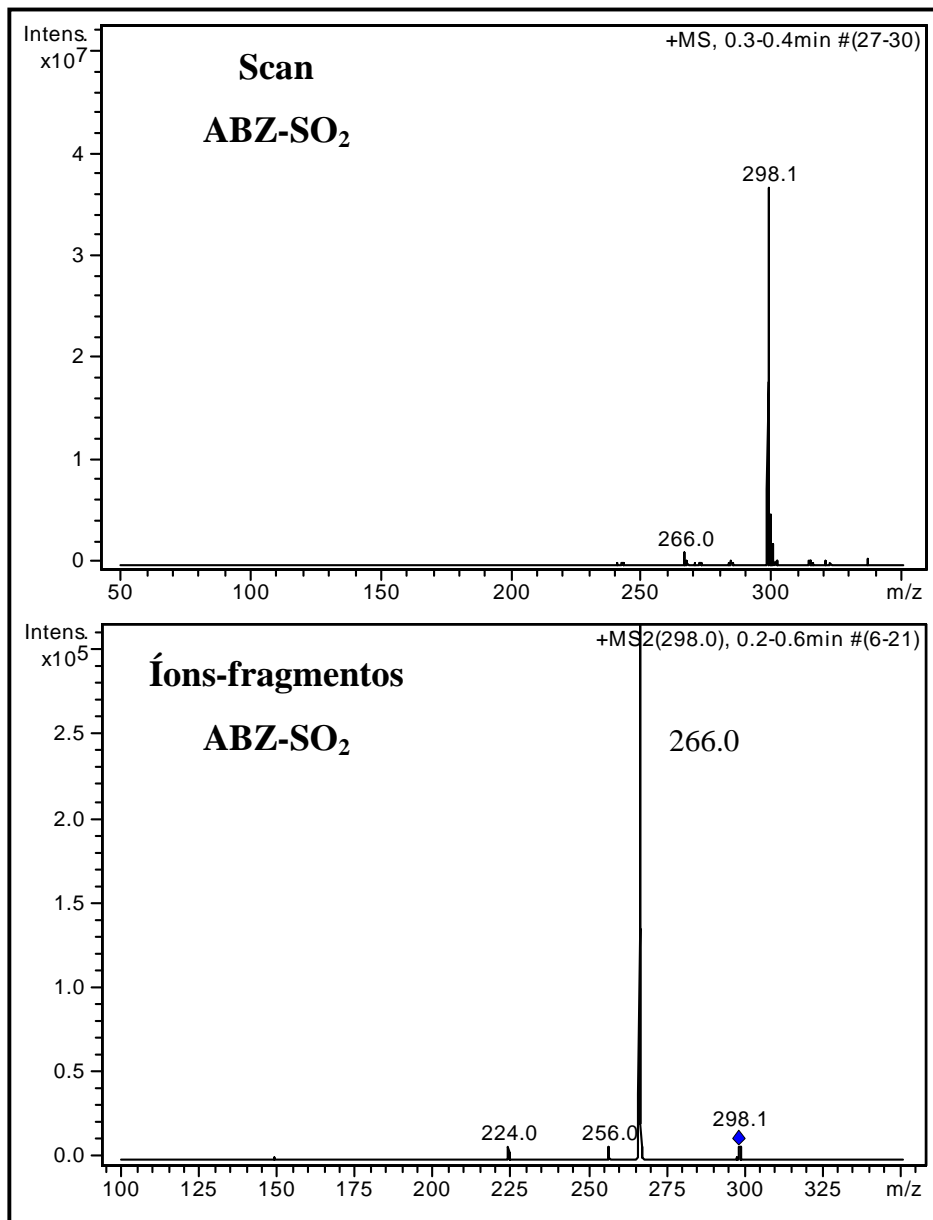


Figura 4.88 – Continuação.

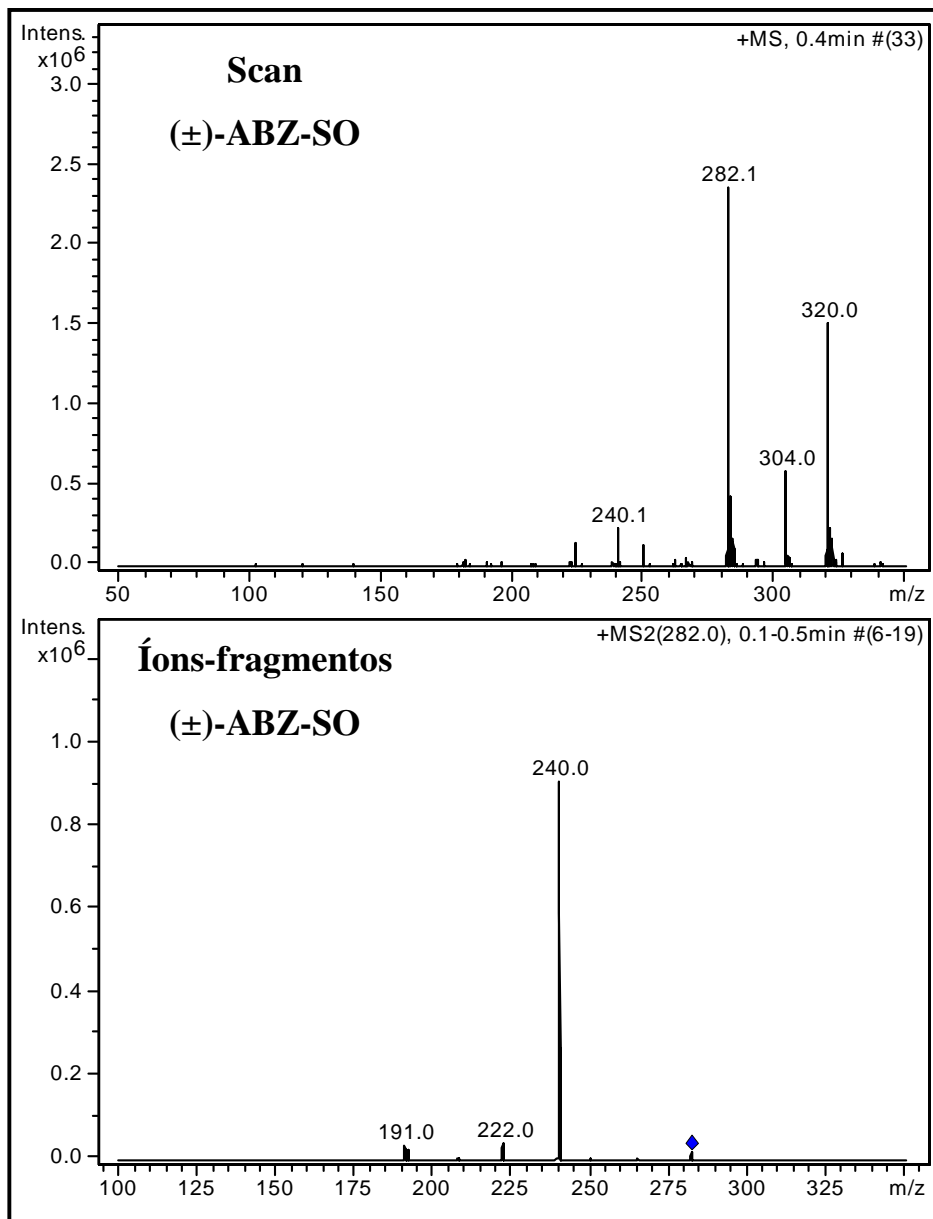


Figura 4.88 – Continuação.

**Tabela 4.37** – Transições selecionada para monitoramento nos experimentos de MRM.

<b>Composto</b>	<b>Transições monitoradas</b>
ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 240	240 → 198 240 → 133
ABZ-SO <sub>2</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 298	298 → 256 298 → 266
(±)-ABZ-SO [M+H] <sup>+</sup> = 282	282 → 222 282 → 240

**Tabela 4.38:** Condições de ionização otimizadas para a análise do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> – 0 à 10,1 minutos.

<b>Tune Source (ESI+)</b>	<b>Set</b>
Capillary Current Control	Off
Trap Drive	40.9
Skimmer	40V
Lens 1	-5 V
Octapole RF amplitude	140,3 Vpp
Partition	6,8V
Lens 2	-60,0V
Capillary exit	109,0V
Oct 1 D.C	12,0V
Oct 2 D.C	1,70V
HV end plate offset	-500V
Current end plate	217,500nA
HV capillary	4000V
Dry temp	325 °C
Dry gás	8,0L/min
Nebuliser	20,0psi
<b>Trap</b>	
Charge control	On
Accumulation time	50000 µs
ICC target	70000
Max accumulation time	50000 µs
Averages	7 spectra
<b>Vacuum System</b>	
Vacuum high	1,07 e <sup>-0,05</sup> mbar
Vacuum fore	3,25 e <sup>+000</sup> mbar

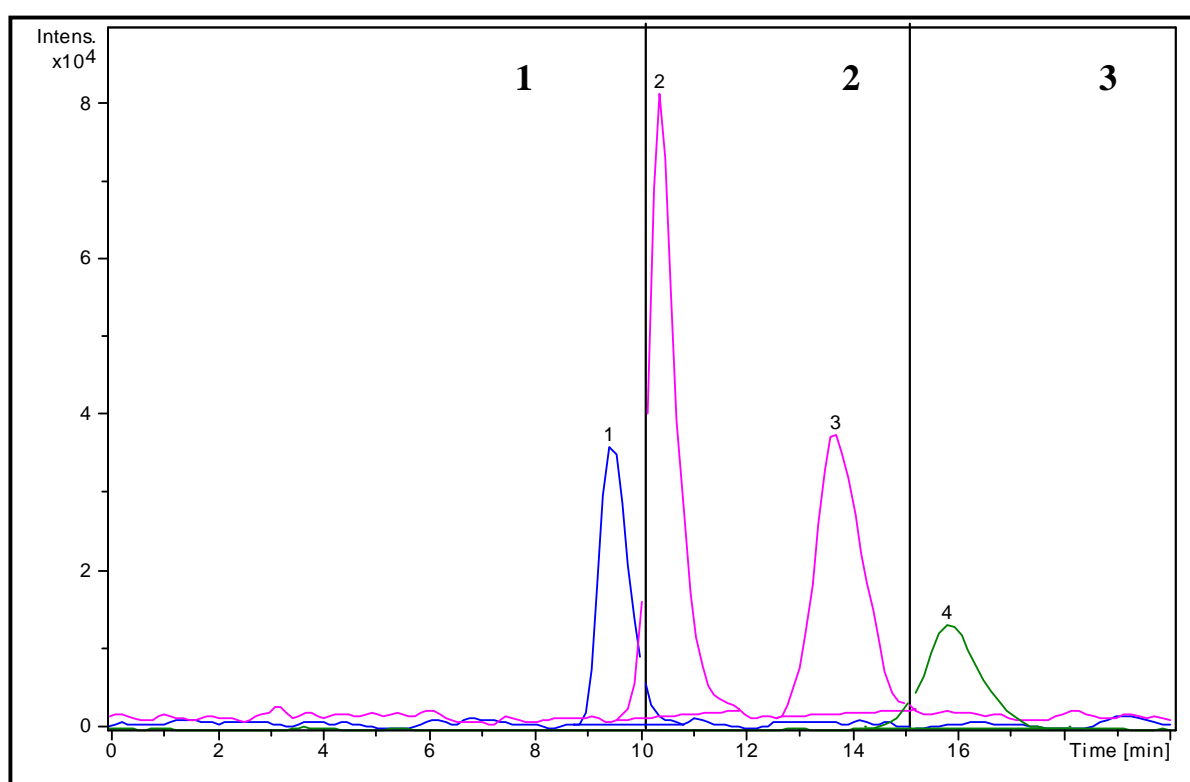
**Tabela 4.39:** Condições de ionização otimizadas para a análise do (±)-ABZ-SO – 10,1 à 15,0 minutos.

<b>Tune Source (ESI+)</b>	<b>Set</b>
Capillary Current Control	Off
Trap Drive	44,00
Skimmer	40V
Lens 1	-5V
Octapole RF amplitude	149,2 Vpp
Partition	4,3V
Lens 2	-60,0V
Capillary exit	112,2V
Oct 1 D.C	12,0V
Oct 2 D.C	1,70V
HV end plate offset	-500V
HV capillary	4000V
Dry temp	325°C
Dry gás	8,0L/min
Nebuliser	20,0psi
<b>Trap</b>	
Charge control	On
Accumulation time	50000 µs
ICC target	70000
Max accumulation time	50000 µs
Averages	7 spectra
<b>Vacuum System</b>	
Vacuum high	1,07 e <sup>-0,05</sup> mbar
Vacuum fore	3,25 e <sup>+000</sup> mbar

**Tabela 4.40:** Condições de ionização otimizadas para a análise do ABZ-SO<sub>2</sub> – 15,0 à 20,0 minutos.

<b>Tune Source (ESI+)</b>	<b>Set</b>
Capillary Current Control	Off
Trap Drive	45,20
Skimmer	40V
Lens 1	-5 V
Octapole RF amplitude	152,4 Vpp
Partition	4,3V
Lens 2	-5,0V
Capillary exit	113,3V
Oct 1 D.C	12,0V
Oct 2 D.C	1,70V
HV end plate offset	-500V
HV capillary	4000V
Dry temp	325°C
Dry gás	8,0L/min
Nebuliser	20,0psi
<b>Trap</b>	
Charge control	On
Accumulation time	50000 µs
ICC target	70000
Max accumulation time	50000 µs
Averages	7 spectra
<b>Vacuum System</b>	
Vacuum high	1,07 e <sup>-0,05</sup> mbar
Vacuum fore	3,25 e <sup>+000</sup> mbar

As condições de quantificação pelo espectrômetro de massa precisou ser dividido em 3 segmentos referentes ao máximo de ionização de cada composto levando em consideração a separação cromatográfica entre eles. A **Figura 4.87** apresenta o cromatograma obtido para uma solução contendo os quatro compostos avaliados. Foi também avaliado parâmetros de ionização intermediários para as três classes de compostos mas problemas com relação a precisão do método foi observado.



**Figura 4.87** – Cromatograma de análise dos metabólitos (1) ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (9,0 ng/mL); (2) R-(+)-ABZ-SO (27 ng/mL); (3) S-(-)-ABZ-SO (27 ng/mL) e (4) ABZ-SO<sub>2</sub>.ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (27 ng/mL) em leite bovino utilizando as colunas RAM-C<sub>8</sub>-BSA (5,0 x 0,46 cm d.i.) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (15,0 x 0,46 cm d.i.), com detecção por MS. Bomba 1 (A) água 100%; (B) água:CH<sub>3</sub>CN (60:40) e (C): CH<sub>3</sub>CN /água/ISO (75:15:10); vazão de 1,0 mL/min. Bomba 2 (D): água: CH<sub>3</sub>CN (60:40); vazão de 0,8 mL/min; volume de injeção: 100 µL.



Estabelecidas as condições cromatográficas, foi realizado um estudo do efeito de matriz para garantir a eficiência do método.

FU e colaboradores <sup>134</sup> destacaram, em um estudo envolvendo a determinação de indinavir em urina humana por LC-MS/MS, o efeito da matriz na ionização e conseqüentemente na sensibilidade e precisão das análises. De acordo com o trabalho, com um melhor tratamento da amostra uma diminuição acentuada do coeficiente de variação (precisão medida pelas áreas dos picos) foi obtida.

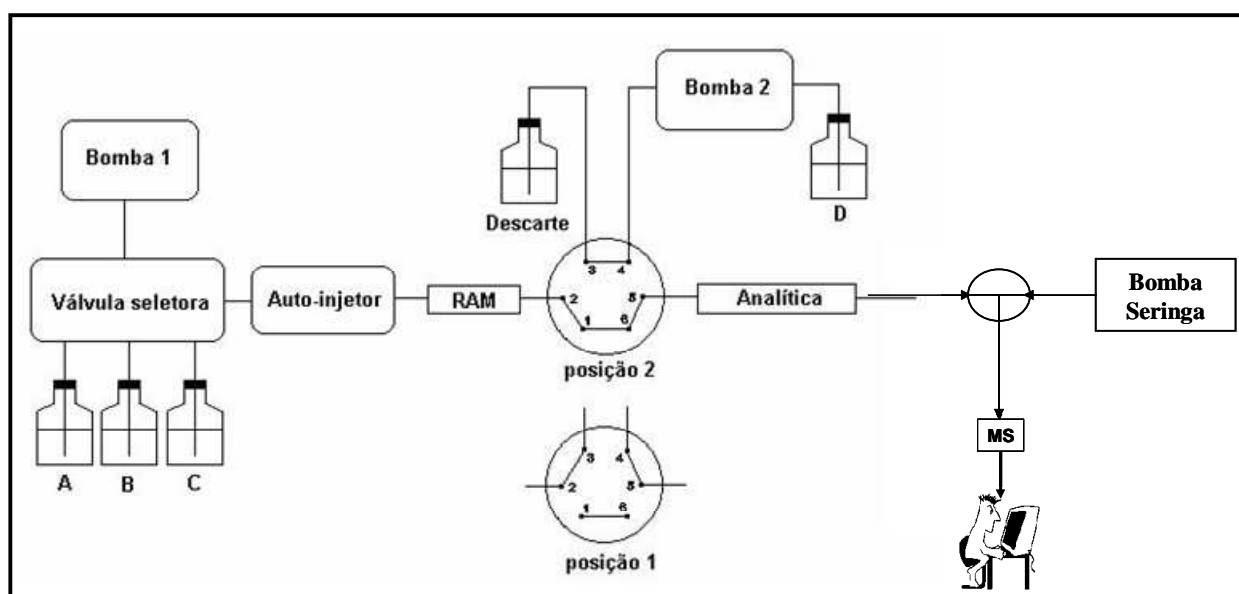
Poucos são os trabalhos em fluidos biológicos por LC-MS que discutem e apresentam estudos envolvendo o efeito da matriz principalmente utilizando injeção direta de amostras biológicas, uma vez que os órgãos reguladores (FDA nos EUA e a união européia, por exemplo), embora recomendem, não possuem nenhuma exigência com relação a este tipo de estudo. ROGATSKY e STEIN <sup>163</sup>, recentemente apresentaram uma discussão sobre a necessidade e a importância desse tipo de estudo no desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos.

De acordo com os protocolos de validação dos órgãos reguladores, o espectrômetro de massa é considerado um outro tipo de detector passivo; os efeitos da matriz não são considerados para a maioria das validações se não há influência na reprodutibilidade e linearidade do método. <sup>163</sup>

Os efeitos da matriz podem fortemente suprimir a eficiência da ionização da amostra, levar a um aumento do ruído da linha de base, entre outros efeitos negativos, diminuindo a sensibilidade do método de modo que, um estudo do efeito causado pela matriz torna-se importante como variável no controle de qualidade da otimização do método.

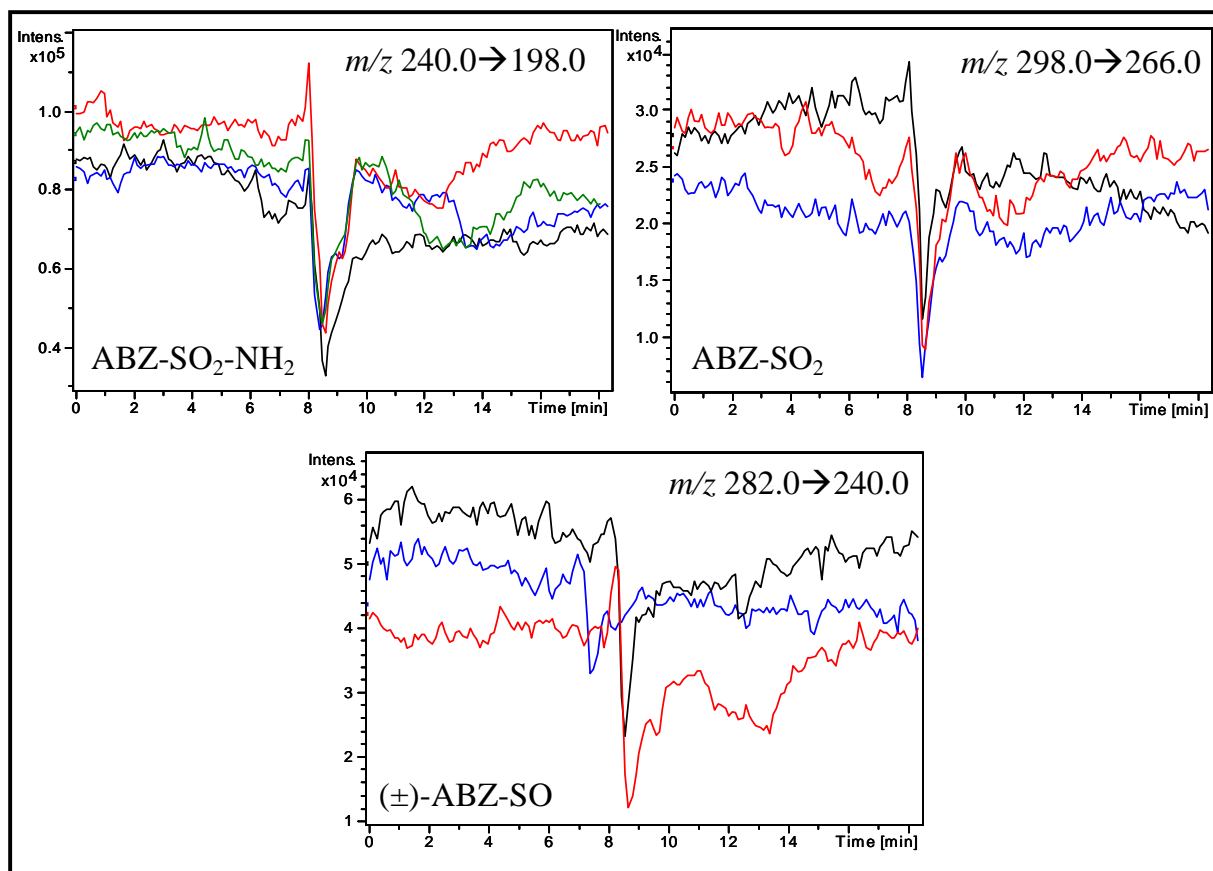
Os estudos envolvendo os efeitos da matriz destacam que as condições cromatográficas e/ou pré-tratamento da amostra são diretamente responsáveis pela eficiência da ionização da amostra. <sup>133-136; 163-165</sup>

Deste modo, utilizando o esquema representado na **Figura 4.88** e as condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.36**, as soluções dos metabólitos (100 ng/mL cada) foram infundidas separadamente com o auxílio da bomba seringa e as respostas foram medidas contra injeções realizadas no sistema cromatográfico de amostras de leite desnatado e integral e água.



**Figura 4.88** – Representação esquemática do sistema utilizado para o estudo de efeito de matriz.

A **Figura 4.89** apresenta os resultados obtidos. É possível verificar uma deflexão na linha de base entre 8 e 10 minutos de análise referente à virada da válvula para o acoplamento das colunas. Nenhuma outra alteração significativa no cromatograma é observado para os três compostos avaliados, de modo que pode-se inferir que não há um efeito expressivo da matriz que poderia atrapalhar a validação do método.



**Figura 4.89** – Cromatogramas representativos do estudo de efeito de matriz. (----) – leite integral; (----) – leite desnatado; (----) – água e (----) – efeito da válvula de acoplamento.

Com as condições cromatográficas estabelecidas para a quantificação simultânea dos metabólitos do albendazol, ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, foi construída uma curva de calibração para cada metabólito levando em consideração as transições apresentadas na **Tabela 4.37**.

No entanto, os valores de CV obtidos (**Tabela 4.41**) foram bastante discrepantes, principalmente para as amostras controle de qualidade variando de 6,66 a 36,1% para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; de 13,7 a 92,7% para o R-(+)-ABZ-SO; de 6,57 a 92,7% para o S-(-)-ABZ-SO e de 3,55 a 33,4% para o ABZ-SO<sub>2</sub>. Estes

valores encontram-se completamente fora dos limites estabelecidos pela ANVISA<sup>157</sup> para precisão de métodos bioanalíticos.

**Tabela 4.41:** Precisão (CV%) dos valores da curva de calibração para a análise de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=3) em leite bovino.

Concentração (ng/mL)	1º dia (n=5)	2º dia (n=5)	3º dia (n=5)	3 dias (média) (n=15)
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>				
9,20	14,3	11,5	36,1	20,6
13,0	10,4	12,9	31,7	18,3
19,0	6,66	7,30	32,2	15,4
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>				
27,2	27,3	69,5	92,7	63,2
39,0	18,8	50,0	56,4	41,7
57,0	13,7	86,5	28,1	42,8
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>				
27,2	14,7	12,5	92,7	40,0
39,0	68,5	83,1	41,3	64,3
57,0	6,57	49,6	27,9	84,1
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>				
27,2	6,85	11,2	20,9	13,0
39,0	8,76	15,3	33,4	19,1
57,0	3,55	6,91	27,9	12,8

Considerando problemas na ionização das moléculas, foram realizados vários testes e modificações nos parâmetros do espectrômetro de massa. Mesmo

assim, continuaram altos os coeficientes de variação para as replicatas das amostras controle. Foi verificado, no entanto, que os resultados apresentavam uma melhora significativa quando o espectrômetro de massa era programado para monitorar somente uma transição de cada íon.

Esse problema pode ser explicado pelo princípio de funcionamento do íon-trap. Existem dois tipos de sistemas MS-MS: “tandem no espaço” e “tandem no tempo”. Os instrumentos que operam em “tandem no espaço” apresentam dois analisadores de massas independentes, em localizações diferentes no instrumento. Exemplos deste tipo de equipamento incluem sistemas de triplo quadrupolo (QqQ) e sistemas compostos por um quadrupolo e um analisador de tempo de voo (QqTof). O modo mais comum de operação em sistemas em “tandem no espaço” é a varredura de íons, na qual um íon precursor é selecionado no primeiro quadrupolo. O íon precursor é então sujeito a reações em uma cela de colisão (segundo quadrupolo), e o espectro de massas dos íons fragmentos resultante é obtido a partir do último estágio (terceiro quadrupolo) do espectrômetro de massas.<sup>166</sup>

Os instrumentos que operam em “tandem no tempo” são, em geral, espectrômetros de massas do tipo “ion-trap” e espectrômetros de transformadas de Fourier (FT-ICR). Os vários estágios do espectrômetro de massas são realizados em um mesmo volume físico, mas em tempos diferentes durante o experimento.<sup>166</sup> Deste modo, a quantidade de íons a serem aprisionados, fragmentados e analisados deve estar saturando a resposta do equipamento.

Por este motivo, a validação do método foi realizada monitorando apenas uma transição de cada íon dos metabólitos. A **Tabela 4.42** apresenta os íons selecionados para o monitoramento.

**Tabela 4.42:** Transições selecionadas para monitoramento nos experimentos de MRM.

Composto	Transições monitoradas
ABZ-SO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 240	240 → 198
ABZ-SO <sub>2</sub> [M+H] <sup>+</sup> = 298	298 → 266
(±)-ABZ-SO [M+H] <sup>+</sup> = 282	282 → 240

#### 4.5.2 – VALIDAÇÃO

Com as condições cromatográficas e de ionização estabelecidas para a quantificação simultânea dos metabólitos do albendazol, ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, em amostras de leite bovino, o método analítico foi validado consistindo de avaliações de precisão inter e intradia, exatidão, eficiência de extração, linearidade, seletividade, limites de quantificação e detecção e estudos relacionados à estabilidade.

A análise dos metabólitos foi realizada, utilizando-se as condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.36** e as condições de ionização descritas nas **Tabelas 4.38, 4.39 e 4.40**.

Análises por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) geralmente são consideradas capazes de gerar respostas seletivas. No entanto, em situações mais complexas, a observação de múltiplas transições de MRM pode aumentar ainda mais a seletividade. Neste método, foi monitorada somente uma transição específica de cada íon, no entanto, além do monitoramento desses íons, a seletividade do método foi também avaliada pelo estudo de efeito de matriz.

Os cromatogramas do estudo de efeito de matriz são apresentados na **Figura 4.89** onde pode-se verificar que não há interferências significativas para os compostos, mostrando que o método é seletivo para as quatro bandas cromatográficas.

Para a construção das curvas de calibração, os intervalos de concentração utilizados foram estipulados, baseados no limite máximo residual (LMRs) dos metabólitos do albendazol em leite.

As curvas de calibração para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 8,00; 9,00; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 e 20,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 27,0; 30,0; 36,0; 42,0; 48,0; 54,0 e 60,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub> e para cada um dos enantiômeros do (±)-ABZ-SO. As amostras foram preparadas em leite bovino, em triplicata, e foram injetados 100 µL.

Os modelos matemáticos para curvas de calibração podem ser tanto lineares quanto não-lineares nos seus parâmetros. A escolha entre esses dois grupos de modelos dependerá do tipo de método e/ou da faixa de concentração de interesse. Como regra geral, deve ser selecionado o modelo que melhor representa a relação sinal/concentração dos analitos avaliados.<sup>167</sup>

Neste caso, as curvas analíticas foram obtidas através de um modelo de regressão ponderada (1/X) quadrática não linear apresentados na **Figura 4.90**.

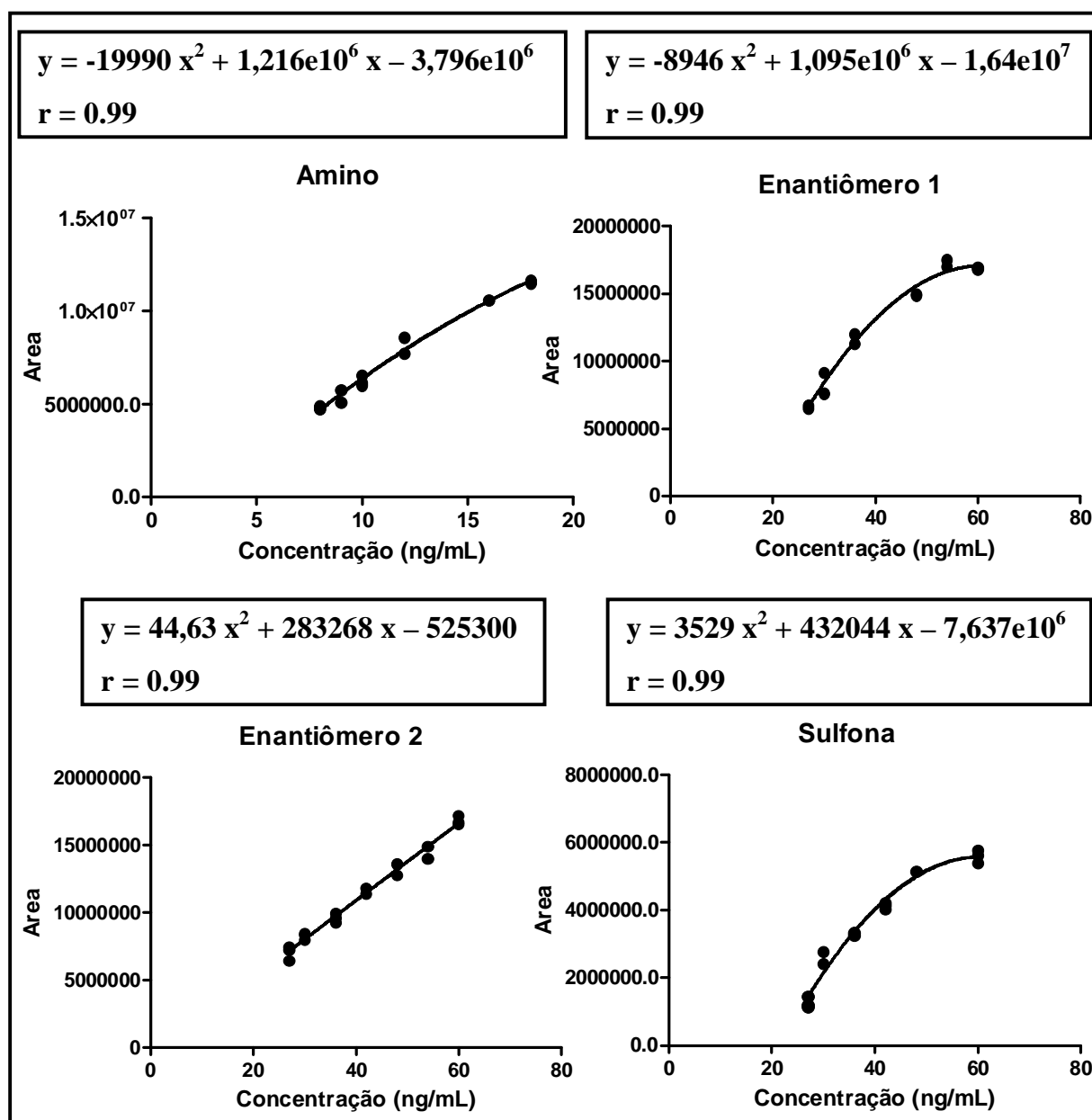


Figura 4.90 – Curvas analíticas para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>.

Os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) obtidos das curvas de calibração foram acima de 0,98; a precisão das triplicatas foi inferior a 15% e a exatidão apresentou um desvio menor que 15 % do valor nominal de concentração em todas as concentrações da curva, exceto para o limite de quantificação, onde o



desvio encontrado foi de 20%. Todos os valores obtidos estão dentro dos critérios de aceitação de métodos em fluidos biológicos especificados pela ANVISA.<sup>157</sup>

A precisão e a exatidão intradia e interdias do método foram avaliadas analisando-se cinco replicatas dos três controles de qualidade (9,20; 13,0 e 19,0 ng/mL para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; 27,2; 39,0 e 57,0 µg/mL para cada enantiômero do (±)-ABZ-SO e também para o ABZ-SO<sub>2</sub>), em um mesmo dia e em dias não consecutivos. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação obtida da curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as quantidades adicionadas e as quantificadas, nas três concentrações avaliadas. Os resultados são apresentados na **Tabela 4.43**.

A precisão apresentou para as replicatas das amostras coeficientes de variação entre 1,50 e 15,0 considerando-se os resultados obtidos para todos os compostos, enquanto que os valores de exatidão variaram entre 84,9 e 113% das concentrações nominais. Todos os valores estão dentro dos critérios de aceitação.<sup>157</sup>

A precisão e exatidão do método foram também avaliadas pelas análises de duas amostras, de concentrações desconhecidas ao analista, e chamado de teste cego. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.44**, e todos estão de acordo com os critérios de aceitação para o método.

**Tabela 4.43:** Exatidão (%) e precisão (CV%) intradia e interdias, para a análise de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=5) em leite bovino.

Concentração (ng/mL)	1° dia (n=5)		2° dia (n=5)		3° dia (n=5)		3 dias (média) (n=15)	
	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV	Exatidão	CV
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
9,20	86,6	9,24	84,9	4,64	85,9	5,58	85,8	6,49
13,0	85,8	11,1	85,4	12,1	87,4	7,49	86,7	10,2
19,0	85,4	1,51	84,9	1,68	85,7	1,50	104	1,56
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
27,2	105	12,3	106	14,8	105	14,6	105	13,9
39,0	94,1	15,0	91,6	5,34	99,6	10,6	95,1	10,3
57,0	85,3	7,24	87,3	4,79	86,5	3,78	86,4	5,27
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
27,2	102	5,47	99,0	4,90	92,0	3,69	97,7	4,69
39,0	105	5,87	97,1	5,69	93,7	7,62	98,6	6,39
57,0	96,9	1,74	97,6	6,41	96,2	9,77	96,9	5,97
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
27,2	113	14,1	113	14,9	108	10,5	111	13,2
39,0	95,0	10,9	91,8	14,3	87,4	14,1	91,4	13,1
57,0	85,8	7,57	85,7	6,77	88,7	8,36	86,7	7,57

**Tabela 4.44:** Precisão e exatidão obtidas no teste cego de ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de leite bovino (n=3).

Analito	Concentração (ng/mL)	Precisão (CV) (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>			
Amostra 1	9,60	10,1	98,2
Amostra 2	16,8	6,66	109
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>			
Amostra 1	28,8	9,28	89,4
Amostra 2	50,4	11,8	86,6
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>			
Amostra 1	28,8	1,02	85,0
Amostra 2	50,4	9,04	87,3
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>			
Amostra 1	28,8	5,65	87,8
Amostra 2	50,4	13,4	86,7

Os percentuais de eficiência de extração para os quatro analitos, em cada concentração, foram calculados pela razão entre o valor médio das áreas encontradas nas amostras preparadas em leite bovino (n=5) com os resultados das amostras (n=5) preparadas no solvente água:CH<sub>3</sub>CN (40:60). Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.45**.

Os valores obtidos mostraram que a coluna extratora (RAM-C<sub>8</sub>-BSA) é eficiente para a extração dos analitos do leite bovino e na transferência destes para a coluna analítica.

**Tabela 4.45:** Eficiência de extração obtida para as amostras controle de qualidade do ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> (n=5)

Analito (ng/mL)	Recuperação (%)	Analito (ng/mL)	Recuperação (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>		<b>R-(+)-ABZ-SO</b>	
9,20	92,8	27,2	81,0
13,0	109	39,0	72,2
19,0	112	57,0	77,9
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>		<b>S-(-)-ABZ-SO</b>	
27,2	71,8	27,2	70,1
39,0	75,9	39,0	110
57,0	77,6	57,0	73,5

O critério de aceitação para o limite de quantificação foi que a precisão e a exatidão de três amostras extraídas não ultrapassassem o valor de 20 % de variabilidade, enquanto que o limite de detecção foi calculado, obtendo-se um sinal três vezes maior que o ruído do detector. Os valores obtidos para os limites de quantificação e de detecção estão apresentados na **Tabela 4.46**.

**Tabela 4.46:** ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de leite bovino (n=3).

Analito	Limite de Quantificação (ng/mL)	Limite de Detecção (ng/mL)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>	6,00	0,30
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>	24,0	0,55
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>	24,0	0,50
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>	24,0	0,30

Para a realização dos testes de estabilidade, foram utilizadas amostras preparadas nas concentrações dos controles de qualidade e os fármacos foram considerados estáveis na matriz biológica e em solução, quando foram observadas variações inferiores a 15 % com relação às concentrações iniciais.

A estabilidade das amostras em solução (água:CH<sub>3</sub>CN – 50:50) foi avaliada por um período de 10 dias e de acordo com os resultados obtidos todos os metabólitos apresentaram-se estáveis no período avaliado.

Para a avaliação da estabilidade das amostras após ciclos de congelamento e degelo, as amostras foram preparadas nas concentrações dos controles de qualidade do método, foram analisadas imediatamente (tempo zero) e depois de congeladas a -20°C. Nos tempos especificados (24, 48 e 72 horas) as amostras foram degeladas, a temperatura ambiente, e analisadas. A **Tabela 4.47** apresenta os valores de precisão e exatidão das replicatas (n=3) após os três ciclos de degelo.

Através dos dados obtidos pode-se verificar que todos os metabólitos mantiveram-se estáveis após os ciclos de congelamento e degelo. É importante destacar que, embora os valores obtidos no terceiro ciclo estejam dentro dos limites estabelecidos, os valores obtidos para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> e o ABZ-SO<sub>2</sub> indicam que esses compostos não suportariam mais um ciclo de degelo.

**Tabela 4.47:** Resultados do estudo de estabilidade a ciclos de degelo para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub> em amostras de leite bovino (n=3).

Analito (ng/mL)	Tempo Zero		1° Ciclo		2° Ciclo		3° Ciclo	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
9,20	9,24	86,6	6,60	104	3,27	111	4,64	112
13,0	11,1	85,8	3,53	90,3	2,90	95,1	2,25	88,5
19,0	1,51	85,4	4,32	88,4	4,80	113	2,15	86,5
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
27,2	12,3	105	6,50	112	2,54	95,7	9,29	114
39,0	15,0	94,1	3,42	93,2	3,92	99,5	2,84	106
57,0	7,24	85,3	3,39	89,3	1,03	98,7	2,11	102
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
27,2	5,47	102	6,62	109	6,57	112	4,25	89,3
39,0	5,87	105	4,37	94,8	4,19	96,2	5,24	95,8
57,0	1,74	96,9	4,07	97,5	3,17	98,6	3,10	96,7
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
27,2	14,1	113	5,21	96,8	2,30	93,0	1,63	87,0
39,0	10,9	95,0	3,50	99,3	5,76	102	5,48	85,3
57,0	7,57	85,8	5,84	93,0	2,03	107	8,57	84,9

Para a avaliação da estabilidade de curta duração, as amostras preparadas nas concentrações dos controles de qualidade foram analisadas imediatamente e depois de deixadas em repouso a temperatura ambiente na bancada por seis horas.

A estabilidade das amostras, durante a permanência no auto-injetor, foi avaliada durante um período de 10 h, que foi o tempo necessário para a realização da curva de calibração.

Todas as amostras permaneceram estáveis durante os períodos, avaliados, com coeficientes de variação inferiores a 15 % e exatidão dentro dos limites de aceitação do método.<sup>157</sup>

O estudo da estabilidade de longa duração tem como objetivo estabelecer o tempo máximo em que amostras podem permanecer armazenadas, após a coleta, antes de serem analisadas. Para este estudo, as amostras nas concentrações controle foram analisadas imediatamente após a preparação (tempo zero) e armazenadas a -20 °C. As amostras armazenadas foram degeladas uma única vez e analisadas nos seguintes tempos: 3, 5 e 7 dias. Todos os resultados obtidos foram calculados por interpolação na curva de calibração e comparados com os obtidos das amostras analisadas no tempo zero, para obter o valor de exatidão.

A **Tabela 4.48** mostra os valores de precisão e exatidão para as avaliações de estabilidade de longa duração.

As amostras apresentaram estabilidade de 5 dias para o ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> e para os (±)-ABZ-SO; para o ABZ-SO<sub>2</sub> a estabilidade apresentada foi de 3 dias. Após esses períodos os valores de exatidão obtidos foram maiores do que 15% de variação.

**Tabela 4.48:** Resultados da estabilidade de longa duração das amostras de leite, fortificadas com ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, R-(+)-ABZ-SO, S-(-)-ABZ-SO e ABZ-SO<sub>2</sub>, armazenadas a -20°C.

Analito (ng/mL)	Tempo Zero		3 dias		5 dias		7 dias	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
<b>ABZ-SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub></b>								
9,20	86,6	9,24	4,77	101	5,73	86,8	5,90	60,0
13,0	85,8	11,1	5,87	90,2	9,76	89,8	5,45	48,8
19,0	85,4	1,51	4,79	89,5	6,97	90,7	6,70	66,5
<b>R-(+)-ABZ-SO</b>								
27,2	105	12,3	6,98	89,9	3,54	89,8	4,33	45,3
39,0	94,1	15,0	3,12	101	4,98	87,3	2,21	47,8
57,0	85,3	7,24	2,20	97,8	5,11	104	1,03	50,9
<b>S-(-)-ABZ-SO</b>								
27,2	102	5,47	5,78	104	3,44	93,1	8,99	29,7
39,0	105	5,87	6,42	108	6,31	86,9	5,82	40,0
57,0	96,9	1,74	2,04	98,8	5,72	86,2	5,72	56,6
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>								
27,2	113	14,1	4,12	91,2	3,21	47,0	14,9	24,0
39,0	95,0	10,9	2,79	84,9	5,98	36,9	12,0	12,9
57,0	85,8	7,57	3,33	85,5	5,63	45,0	3,20	35,0



# CONCLUSÕES

---

*"Ter problemas na vida é inevitável, ser derrotado por eles é opcional."*

ROGER CRAWFORD

## 5 - CONCLUSÕES

### 5.1 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE COLUNAS RAM-BSA

As colunas RAM-BSA são de fácil preparo e bastante eficientes na exclusão de proteínas do leite utilizando água como fase móvel. O estudo de exclusão protéica realizado para as colunas RAM-BSA nos suportes C<sub>18</sub>, fenil e amino, indicou que a presença de sais na fase móvel altera o perfil de exclusão das proteínas, quando comparado com água. A coluna amino foi a que apresentou pior perfil de exclusão frente às soluções testadas com um tempo de aproximadamente 8 minutos para eficiente exclusão das proteínas. Sua utilização seria mais indicada para compostos não ionizáveis, onde a utilização de água como fase móvel de exclusão pudesse ser feita. As colunas RAM-BSA C<sub>18</sub> e fenil apresentaram perfis de exclusão semelhante, com eficiente exclusão das proteínas até 5 minutos de análise.

O detector de índice de refração utilizado no início do estudo de retenção dos antibióticos aminoglicosídeos, embora já tenha sido usado pra análise de aminoglicosídeos,<sup>33</sup> não apresentou boas respostas, nas condições avaliadas, oferecendo dúvidas com relação aos cromatogramas obtidos. Já, o detector de espalhamento de luz (ELSD) mostrou-se eficiente podendo ser utilizado com confiança em análises para estes antibióticos.

## **5.2 – AVALIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA OS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE PAREAMENTO IÔNICO E DETECÇÃO POR ELSD**

A utilização das colunas RAM-BSA e RAM-ADS em métodos para análises de antibióticos aminoglicosídeos é problemática, uma vez que o comportamento apresentado por estes antibióticos, nessas colunas, é imprevisível. Isto pôde ser constatado nas análises realizadas, onde não foi possível a obtenção de uma fase móvel para eficiente exclusão das proteínas e posterior extração dos antibióticos analisados.

Os estudos envolvendo TFA mostraram que uma possível retenção da gentamicina pode ser obtida em concentrações acima de 0,1M. No entanto, essas concentrações resultariam em valores muito baixos de pH podendo prejudicar além da coluna cromatográfica a exclusão das proteínas do leite.

O estudo de fator de retenção realizado com as colunas analíticas mostrou uma alta seletividade para a gentamicina com o uso do ácido trifluoracético como agente de pareamento iônico e a coluna C<sub>18</sub>, onde a separação dos componentes das gentamicinas foi obtida somente variando a concentração do ácido utilizado. Do mesmo modo foi possível obter também uma separação entre os epímeros da neomicina. Foi também verificado um maior controle dos fatores de retenção com o aumento da concentração dos agentes de pareamento iônico.

Baseado nesses resultados foi desenvolvido e validado três métodos para a análise de controle de qualidade dos três antibióticos aminoglicosídeos: estreptomicina, neomicina e gentamicina em medicamentos veterinários usando o ELSD como detector.

Todos os métodos desenvolvidos mostraram-se práticos, lineares, precisos, exatos e seletivos e foram aplicados com sucesso para medicamentos veterinários comercialmente disponíveis.

O método de quantificação dos componentes da gentamicina proposto apresentou fatores de resposta semelhantes a um método já publicado por quantificação com padronização externa secundária <sup>31</sup> mostrando-se eficiente e confiável, podendo ser utilizado com segurança na quantificação desses compostos em medicamentos.

### **5.3 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR CLAE-MULTIDIMENSIONAL PARA ANÁLISE DE ANTIBIÓTICOS CEFALOSPORÍNICOS EM LEITE BOVINO UTILIZANDO MS COMO DETECTOR**

No desenvolvimento de métodos para análise dos antibióticos cefacetil e cefalexina por LC-MS-MS, foi verificado vários problemas com relação a ionização das moléculas utilizando soluções tamponadas e agentes de pareamento iônico como fases móveis cromatográficas. Essas fases móveis são de fundamental importância para o método multidimensional proposto, uma vez que para ambos antibióticos, um severo controle da ionização deve ser realizado.

O uso dessas condições cromatográficas dificultou o desenvolvimento do método, uma vez que de acordo com os resultados obtidos, uma falta de reprodutibilidade entre as replicatas de análises foi verificada. Uma série de alterações foram avaliadas para um melhor controle na ionização da amostra, mas nenhum resultado positivo foi observado.

Deste modo, não foi possível o desenvolvimento de um método por injeção direta de amostra para análise dos antibióticos cefalosporínicos cefacetil e cefalexina em leite bovino por detecção com MS.

#### **5.4 – DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM MÉTODO ENANTIOSSELETIVO POR INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ALBENDAZOL POR LC-MS-MS EM LEITE BOVINO**

A cromatografia multidimensional foi empregada com sucesso para a análise simultânea do (+) e (-)- albendazol-sulfóxido, do albendazol-sulfona e para o albendazol-amino-sulfona, em leite bovino, com injeção direta de amostras. Este tipo de análise permitiu o desenvolvimento de um método prático, linear, exato, preciso, seletivo e sensível podendo ser utilizado para estudos farmacocinéticos enantiosseletivos e para estudos de análise de resíduos dos mesmos.

Foi importante também nesse tipo de desenvolvimento, o estudo de efeito de matriz realizado. De acordo com esse estudo foi possível verificar que a coluna RAM-BSA utilizada para excluir os interferentes e extrair os analitos de interesse foi eficiente. Nenhuma alteração significativa na ionização da amostra causada pela matriz avaliada foi observada.

# *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

---

*"Se você não aprende a rir das dificuldades, você  
não terá nada para rir quando estiver velho."*

*EDGAR WATSON HOWE*

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- STOLKER, A. 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*, **1067**: 15-53, 2005.

2- TOLDRÁ, F.; REIG, M. “Method for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods”. *Trends in Food Science & Technology*, **17**: 482-489, 2006.

3- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry. Evaluating the Safety of Antimicrobial New Animal Drugs with Regard to Their Microbiological Effects on Bacteria of Human Health Concern.** U.S. Department of Health and Human Services, Center for Veterinary Medicine, 2003, 36 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cvm/guidance>>. Acesso em: 10 Dez. 2003.

4- OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN COMMUNITIES. Council Regulation (EEC) n° 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medical products in foodstuffs of animal origin (OJ n° L 224, 18.8.1990), Annex I., 2002, 29 p. Disponível em: <<http://cemu10.fmv.ulg.ac.be/ostc/902377/902377reg.html>>. Acesso em: 10 Dez. 2003.

5- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretária de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 42, de 20 de Dezembro de 1999.

6- MARZO, A.; DAL BO. L. “Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications”. *Journal of Chromatography A*, **812**: 17-34, 1998.

7- FEDENIUK, R. W.; SHAND, P. J. “Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices”. *Journal of Chromatography A*, **812**: 3-15, 1998.

8- SCHENCK, F. J.; CALLERY, P. S. “Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk”. *Journal of Chromatography A*, **812**: 99-109, 1998.

9- MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. “Avaliação das Características Físico-Químicas do Queijo Minas Produzido com Leite Contendo Diferentes Níveis de Células Somáticas”. *Subprojeto de pesquisa – bolsa de iniciação científica – Relatório Final*“. Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, p. 3-6, 2004.

10- ARASHIRO, E. K. N.; TEODORO, V. A. M.; MIGUEL, E. M. “Mastite Bovina: Importância Econômica e Tecnológica“. Disponível <<http://www.cienciadoleite.com.br/mastitebovinaimportancia.htm>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2007.

11- KENNEDY, D. G.; McCracken, R. J.; CANNAN, A.; HEWITT, S. A. “Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk”. *Journal of Chromatography A*, **812**: 77-98, 1998.

12- ISOHERRANEN, N.; SOBACK, S. “Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics”. *Journal of AOAC International*, **82**: 1017-1045, 1999.

13- STEAD, D. A. “Current methodologies for the analysis of aminoglycosides”. *Journal of Chromatography B*, **747**: 69-93, 2000.

14- McLAUGHLIN, L. G.; HENION, J. D. “Determination of aminoglycosides antibiotics by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometry and ion spray mass spectrometry”. *Journal of Chromatography*, **591**: 195-206, 1992.



**15-** CHERLET, M.; De BAERE, S.; De BACKER, P. “Determination of gentamycin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry”. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**: 1342-1350, 2000.

**16-** GETEK, T. A.; VESTAL, M. L.; ALEXANDER, T. G. “Analysis of gentamicin sulfate by high-performance liquid chromatography combined with thermospray mass spectrometry”. *Journal of Chromatography*, **554**: 191-203, 1991.

**17-** STOLKER, A. 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*, **1067**: 15-53, 2005.

**18-** HORNISH, R. E.; WIEST, J. R. “Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ionexchangehigh-performance liquid chromatography with post-column derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, **812**: 123-133, 1998.

**19-** CARSON, M. C.; HELLER, D. N. “Confirmation of spectinomycin in milk using ion-pair solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray ion trap mass spectrometry”. *Journal of Chromatography B*, **718**: 95-102, 1998.

**20-** EDDER, P.; CAMINOLI, 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*, **830**: 345-351, 1999.

**21-** STEAD, D. A.; RICHARDS, R. M. E. “Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed phase high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography B*, **675**: 295-302, 1996.

**22-** STEAD, D. A.; RICHARDS, R. M. E. “Sensitive high-performance liquid chromatography assay for aminoglycosides in biological matrices enables the direct estimation of bacterial drug uptake”. *Journal of Chromatography B*, **693**: 415-421, 1997.

**23-** FENNELL, M. A.; UBOTH, C. E.; SWEENEY, R. W.; SOMA, L. R. “Gentamicin in Tissue and Whole Milk: An Improved Method for Extraction and Cleanup of Samples for Quantitation on HPLC”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 1849-1852, 1995.

**24-** HAAGSMA, N.; SCHERPENISSE, P.; SIMMONDS, R. J.; WOODS, S. A.; REES, S. A. “High-performance liquid chromatographic determination of spectinomycin in swine, calf and chicken plasma using post-column derivatization”. *Journal of Chromatography B*, **672**: 165-171, 1995.

**25-** KIJAK, P. J.; JACKSON, J.; SHAIKH, B. “Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection”. *Journal of Chromatography B*, **691**: 377, 1997.

**26-** POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSKA, J. “Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A*, **914**: 59-66, 2001.

**27-** NIESSEN, W. M. A. “Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, **812**: 53-75, 1998.

**28-** ZHOU, S.; HAMBURGER, M. “Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis. Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces”. *Journal of Chromatography A*, **755**: 189-204, 1996.

**29-** KOHLER, M.; HAERDI, W.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J.L. “The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis”. *Trends in Analytical Chemistry*, **16 (8)**: 475-484, 1997.

**30-** LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. “Evaporative light scattering detector: trend in its analytical uses”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**: 1663-1672, 2007.

**31-** MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. “Development and validation of a novel LC/ELSD method for the quantitation of gentamicin sulfate components in pharmaceutical”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **36**: 73-79, 2004.

**32-** MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. “Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape”. *Journal of Chromatography A*, **1057**: 125-131, 2004.

**33-** INCHAUSPÉ, G.; SAMAIN, D. “Use of perfluorinated carboxylic acids in the separation of aminoglycoside antibiotics by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography*, **303**: 277-282, 1984.

**34-** CLAROT, I.; CHAIMBAULT, P.; HASDENTEUFEL, F.; NETTER, P.; NICOLAS, A. “Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection”. *Journal of Chromatography A*, **1031**: 281-287, 2004.

**35-** MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. “Direct determination of kanamycin in raw materials, veterinary formulation and culture media using a novel liquid chromatography – evaporative light scattering method”. *Analytica Chimica Acta*, **547**: 64-72, 2005.

**36-** SARRI, A. K.; MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. “Development of a novel liquid chromatography – evaporative light scattering detection method for bacitracins and applications to quality control of pharmaceuticals”. *Analytica Chimica Acta*, **573-574**: 250-257, 2006.

**37-** MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. “Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma and urine”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**: 290-296, 2005.

**38-** GALANAKIS, E. G.; MEGOULAS, N. C.; SOLICH, P.; KOUPPARIS, M. A. “Development and validation of a novel LC non-derivatization method for the determination of amikacin in pharmaceuticals based on evaporative light scattering detection”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **40**: 1114-1120, 2006.

**39-** SILVA, P. “Antibióticos beta-lactâmicos”. IN: *Farmacologia*. SILVA, P. (Ed.). 6ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p. 1001-1021.

**40-** ROCHA, H. “Cefalosporinas”. IN: *Farmacologia*. SILVA, P. (Ed.). 6ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p. 1032-1039.

**41-** PATRICK, G. L. “Antibacterial Agents”. IN: *Medicinal Chemistry*. PATRICK, G. L. (Ed.). 2<sup>nd</sup> ed., New York: Oxford University Press, 2001, p. 373-419.

**42-** PETRI, W. A. JR. “Antimicrobial agents: penicillins, cephalosporins, and other  $\beta$ -lactam antibiotics”. IN: *The Pharmacological Basis of*

*Therapeutics*. HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds.). 10<sup>th</sup> ed., Nova Iorque, McGraw-Hill, 2001, p. 1206-1218.

**43-** KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. “Antibióticos”. IN: *Química Farmacêutica*. KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. H. (Eds.). 1<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988, p. 575-610.

**44-** SOUZA, J. C. de. *Antibióticos Anti-bacterianos*. SOUZA, J. C. de.(Ed.). 1<sup>a</sup> ed., Porto, Publicações Farmácia Portuguesa, 2001, p.1-325.

**45-** PÉHOURECQ, F.; JARRY, C. “Determination of third-generation cephalosporin by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies”. *Journal of Chromatography. A*, **812**: 159-178, 1998.

**46-** BAFELTOWSKA, J. J.; BUSZMAN, E.; MANDAT, K.; HAWRANEK, J. “Determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography. A*, **976**: 249-254, 2002.

**47-** JOHNSON, V. M.; ALLANSON, J. P.; CAUSON, R. C. “Determination of the cephalosporin antibiotic cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection”. *Journal of Chromatography. B*, **740**: 71-80, 2000.

**48-** NISHINO, H.; FUJITOMO, H.; UMEDA, T. “Determination of a new oral cephalosporin, cefmatilen hydrochloride hydrate, and its seven metabolites in human and animal plasma and urine by coupled systems of ion-exchange and reversed high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography. B*, **749**: 101-110, 2000.

**49-** BOMPADRE, S.; FERRANTE, L.; LEONE, L. “On-line solid-phase extraction of cephalosporins”. *Journal of Chromatography. A*, **812**: 191-196, 1998.

**50-** MOATS, W. A.; ROMANOWSKI, R. D. “Multiresidue determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up” *Journal of Chromatography.A*, **812**: 237-247, 1998.

**51-** MOATS, W. A.; BUCKLEY, S. A. “Determination of free metabolites of ceftiofur in animal tissues with an automated liquid chromatographic cleanup”. *Journal of AOAC International*, **81**(4): 709-713, 1998.

**52-** BREILH, D.; LAVALLEE, C.; FRATTA, A.; DUCINT, D.; CONY-MAKHOUL, P.; SAUX, M. C. “Determination of cefepime and ceftiofur in human serum by high-performance liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction”. *Journal of Chromatography. B*, **734**: 121-127, 1999.

**53-** JOSHI, S. “HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **28**: 795-809, 2002.

**54-** MORSCH, L. M.; BITTENCOURT, C. F.; SOUZA, M. J.; MILANO, J. “LC method for the analysis of cefetamet pivoxil hydrochloride in drug substance and powder for oral suspension”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**: 643-649, 2002.

**55-** HSU, M.; LIN, Y.; CHUNG, H. “High-performance liquid chromatographic method for potency determination of cephalexin in commercial preparations and for stability studies”. *Journal of Chromatography A*, **692**: 67-72, 1995.

**56-** CASS. Q. B., OLIVEIRA, R. V. “Evaluation of Liquid Chromatographic Behavior of Cephalosporin Antibiotics Using Restricted Access Medium Columns for On-line Sample Cleanup of Bovine Milk” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 1180-1187, 2005.

**57-** OLIVEIRA, R. V., DE PIETRO, A. C., CASS, Q. B. “Quantification of cephalixin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup” *Talanta*, **71** (3): 1233-1238, 2007.

**58-** MORENO, L.; IMPERIALE, F.; MONTTIER, L.; ALVAREZ, L.; LANUSSE, C. “Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows”. *Analytica Chimica Acta*, **536**: 91–99, 2005.

**59-** LOUKAS, A. & HOTEZ P. J. “Quimioterapia das Infecções por Helminthos”. IN: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p. 963-981.

**60-** RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. “Fármacos Anti-Helmínticos”. IN: *Farmacologia*, 4º ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p. 622-626.

**61-** Conselho Regional de Medicina Veterinária. “Verminoses dos Bovinos”. Disponível em: [http://crmvp-pr.com.br/index2.php?option=com\\_content&task=view&id=112&Ite](http://crmvp-pr.com.br/index2.php?option=com_content&task=view&id=112&Ite). Acesso em 11/06/2007.

**62-** MALACCO, M. A. F. “Controle Parasitário da Fêmea Bovina”. Disponível em [http://br.merial.com/rage/artigos\\_tecnicos/Cont\\_par\\_fem\\_bovina.pdf](http://br.merial.com/rage/artigos_tecnicos/Cont_par_fem_bovina.pdf) Acesso em 11/06/2007.

**63-** MORENO, L.; ECHEVARRIA, F.; MUÑOZ, ALVAREZ, L.; BRUNI, S. S.; LANUSSE, C. “Dose-Dependent Activity of Albendazole Against Benzimidazole-Resistant Nematodes in Sheep: Relationship between Pharmacokinetics and Efficacy”. *Experimental Parasitology*, **106**: 150-157, 2004.

**64-** DANAHER, M.; RUYCK, H.D.; CROOKS, S. R. H.; DOWLING, G.; O'KEEFFE, M. "Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices". *Journal of Chromatography B*, **845**: 1-37, 2007.

**65-** DAYAN, A. D. "Albendazole, Mebendazole and Praziquantel. Review of Non-Clinical Toxicity and Pharmacokinetics". *Acta Tropica* **86**: 141-159, 2003.

**66-** BATZIAS, C. G.; DELIS, G. A. "Reversed- Phase Liquid Chromatographic Method with Fluorescence Detection for the Simultaneous Determination of Albendazole Sulfoxide, Albendazole –Sulphone e Albendazole-2-Amino Sulphone in Sheep Plasma". *Journal of Chromatography B*, **805**: 267-274, 2004.

**67-** FORMENTINI, E. A.; MESTORINO, O. N.; MARIÑO E. L.; ERRECALDE, J. O. "Pharmacokinetics of Ricobendazole in Calves". *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, **24**: 199-202, 2001

**68-** LANCHOTE, V. L.; MARQUES, M. P. C.; TAKAYANAGUI, O. M.; CARVALHO, R. PAIAS, F. O.; BONATO, P. S. "Simultaneous Determination of Albendazole Sulfoxide Enantiomers and Albendazole Sulfone in Plasma". *Journal of Chromatography B*, **709**: 273-279, 1998.

**69-** KITZMAN, D.; CHENG, K. J.; FLECKENSTEIN, L. "HPLC Assay for Albendazole and Metabolites in Human Plasma for Clinical Pharmacokinetic Studies". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**: 801-813, 2002.

**70-** GARCIA, J. J.; FÉRNANDEZ, F. B.; TORRADO, J. J. Quantitative "Determination of Albendazole and its Main Metabolites in Plasma". *Journal of Chromatography B*, **723**: 265-271, 1999.



**71-** CRISTOFOL, C.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; SÁNCHEZ, S.; ARBOIX, M.; LANUSSE, C. “Albendazole Sulphoxide Enantiomeric Ratios in Plasma and Target Tissues after Intravenous Administration of Ricobendazole to Cattle”. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapapeutics*, **24**: 117-124, 2001.

**72-** WU, Z.; MEDLICOTT, N. J.; RAZZAK, M.; TUCKER, I. G. “Development and Optimization of Rapid HPLC Method for Analysis of Ricobendazole and Albendazole Sulfone in Sheep Plasma”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**: 225-232, 2005.

**73-** PAIAS, F. O.; LANCHOTE, V. L.; TAKAYANAGUI, M. O.; BONATO, P. S. “Enantioselective analysis of Albendazole Sulfoxide in Plasma Using the Chiral Stationary Phase”. *Chirality*, **9**: 722-726, 1997.

**74-** FLETOURIS, D. J.; BOTSOGLOU, N. A.; PSOMAS, I. E.; MANTIS, A. I. “Determination of the Marker Residue of Albendazole in Milk Using Ion-Pair Liquid Chromatography and Fluorescence Detection”. *Analytica Chimica Acta*, **345**: 111-119, 1997.

**75-** SOLANA, H. D.; RODRIGUEZ, J. A.; LANUSSE, C. E. “Comparative Metabolism of Albendazole and Albendazole Sulphoxide by Different Helminth Parasites.” *Parasitological Research*, **87**: 275-280, 2001.

**76-** BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L.; TAKAYANAGUI, O. M. “Simultaneous liquid chromatography–tandem mass spectrometric determination of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone in plasma”. *Journal of Chromatography B*, **783**: 237–245, 2003.

**77-** DE RUYCK, H.; DAESELEIRE, E.; DE RIDDER, H.; VAN RENTERGHEM, R. “Development and validation of a liquid chromatographic–electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk”. *Journal of Chromatography A*, **976**: 181-194, 2002.

**78-** ZROSTLIKOVA, J.; HAJŠLOVA, J.; POUŠTKA, J.; BEGANY, P. “Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography– electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials”. *Journal of Chromatography A*, **973**: 13-26, 2002.

**79-** CHU, P.S.; WANG, R.Y.; BRANDT, T.A.; WEERASINGHE, C.A. “Determination of albendazole-2-aminosulfone in bovine milk using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection”. *Journal of Chromatography*, **620**: 129-135, 1993.

**80-** CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M. “The Use of a Polysaccharide Based Column on Multimodal Elution”. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **23 (13)**: 1029-1038, 2000.

**81-** MONTANARI, C. A.; CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; SOUZA, A. L. S. “A QSERR Study on Enantioselective Separation of Enantiomeric Sulfoxides”. *Analytica Chimica Acta*, **419**: 93-100, 2000.

**82-** CASS, Q. B.; BATIGALHIA, F. “Enantiomeric Resolution of a Series of Chiral Sulfoxides by High-Performance Liquid Chromatography on Polysaccharide-Based Columns with Multimodal Elution”. *Journal of Chromatography A*, **987**, 445-452, 2003.

**83-** CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G. “Discriminação Quiral por CLAE em Carbamatos de Polissacarídeos: Desenvolvimento, Aplicações e Perspectivas”. *Química Nova*, **20 (1)**: 49-57, 1997.

**84-** TIRITAN, M. E. “Resolução Enantiomérica de Sulfóxidos Quirais por CLAE, em carbamatos de Polissacarídeos”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCar, 1996. Tese de Doutorado, 135 p.

**85-** GUIMARÃES, P. “Composição do Leite”. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/composicaooleite.htm>>. Acesso: 20 Dez. 2007.

**86-** Leite - Considerações gerais. Disponível em <<http://www.cienciadoleite.com.br/leiteconsideracoes.htm>>. Acesso em: 20 Dez. 2007.

**87-** MARCONDES, T. “Leite - Expressivo crescimento da produção de Santa Catarina - 19/12/07”. Disponível em <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso: 27 Dez. 2007.

**88-** VILELA, D. “Leite: sua importância econômica, social e nutricional”. Disponível em: <<http://www.pardo-suiço.com.br/artigoleite.htm>>. Acesso: 08 Jan. 2004.

**89-** COSTA, E. O. da. “Qualidade do leite: contagem de células somáticas e resíduo de antimicrobianos”. Disponível em: <<http://www.nucleovet.com.br/02.doc>>. Acesso: 08 Jan. 2004.

**90-** STEVENSON, D. “Sample preparation. In: *High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice*”, Wainer, I.W. and Lough, W.J., ed., Blackie Academic & Professional, Glasgow, p. 168-185, 1995.

**91-** HAGESTAM, H.; PINKERTON, T. C.; “Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography”. *Analytical Chemical.*, **57**: 1757-1763, 1985.

**92-** SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. “Practical HPLC Method Development”, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley and Sons, New York, p. 100-173, 1997.

**93-** QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. “Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica”. *Quimica. Nova*, **24 (1)**: 68-76, 2001.

**94-** BOVANOVA, L.; BRANDSTETEROVA, E. “Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography*, **880**: 149-168, 2000.

**95-** ANDERSON, J. A. “High performance liquid chromatography (direct injection techniques)”. *Clinical Chemistry*, **65**: 434-443, 1993.

**96-** CAVALERI, M.; POLLINI, W.; COLOMBO, L. “Determination of ramoplanin in human urine by high-performance liquid chromatography with automated column switching”. *Journal of Chromatography*, **846**: 185-192, 1999.

**97-** OERTEL, R.; RICHTER, K.; GRAMATTÉ, T.; KIRCH, W. “Determination of drugs in biological fluids by high-performance liquid chromatography with on-line sample processing”. *Journal of Chromatography*, **797**: 203-209, 1998.

**98-** YU, Z.; WESTERLUND, D.; BOOS, K.S. “Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media pre-columns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems”. *Journal of Chromatography*, **704**: 53-62, 1997.

**99-** DESILETS, C.P.; ROUNDS, M.A.; REGNIER, F.E. “Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography*, **544**: 25-39, 1991.

**100-** BOOS, K.-S.; RUDOLPHI, A. “The use of restricted-access media in hplc, part II – Applications”. *LC-GC*, **15 (9)**: 816-823, 1997.

**101-** BOOS, K.-S.; RUDOLPHI, A. “The use of restricted-access media in hplc, part I – classification and review”. *LC-GC*, **15 (7)**: 602-11, 1997.

**102-** PINKERTON, T.C. “High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection”. *Journal of Chromatography*, **544**: 13-23, 1991.

**103-** HAGINAKA, J. “Drug determination in serum by liquid chromatography with restricted access stationary phases”. *Trends in Analytical Chemical*, **10**: 17-22, 1991.

**104-** YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N.; IMAI, H. “Some Characteristics of a Protein-Coated ODS Column and its Use for the Determination of Drugs by the Direct Injection Analysis of Plasma Samples”. *Chromatographia*, **19**: 466-472, 1984.

**105-** CASSIANO, N. M.; LIMA, V.V; OLIVEIRA, R.V; DE PIETRO, A.C.; CASS, Q.B. “Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**: 1462-1469, 2006.

**106-** LIMA V. V. *Colunas de Acesso Restrito e Biorreatores de Enzimas GAPDH: Desenvolvimento e Aplicação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 5, 173 p.

**107-** MENEZES, M.L. and FELIX, G. “Analysis of Organochlorine Pesticides in Plain Milk Using Direct Injection on a ISRP Column with Column Switching”. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19 (19)**: 3221-3228, 1996.

**108-** MENEZES, M.L.; FELIX, G. “On-Line Extraction and Separation of Bendiocarb, Methomyl, Methylparathion and Pentachlorophenol Pesticides from Raw Milk”. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **21 (18)**: 2863-2871, 1998.

**109-** MENEZES, M.L.; FELIX, G. and DEMARCHI, A.C.C.O. “On-Line Extraction and Determination of Carbofuran in Raw Milk by Direct HPLC Injection on a ISRP Column”. *Chromatographia*, **47 (1/2)**: 81-83, 1998.

**110-** ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y. and SATO, T. “Avidin Protein-Conjugated Column for Direct Injection Analysis of Drug

Enantiomers in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography”. *J. Chromatogr.* **572**: 133-141, 1991.

**111-** TANAKA, H.; TAKAHASHI, K. and OHIRA, M. “Characterization of Avidin-Bonded Column for Direct Injection in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography”. *J. Chromatogr. A*, **869**: 151-157, 2000.

**112-** BOOS, K. S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D.; EISENBEIN, F. “Alkyl-diol silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids”. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **352**: 684-690, 1995.

**113-** PERRY, J.A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T.J. and RATEIKE, J.D. “An Improved Internal-Surface Reversed-Phase”. *J. Liq. Chromatogr.*, **15**: 3343-3352, 1992.

**114-** GLUNZ, I.J.; PERRY, J.A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T.J.; Rateike, J.D. and Glunz, P.W. “The Semipermeable Surface, A New Restricted Access Medium”. *J. Liq. Chromatogr.*, **15**: 1361-1379, 1992.

**115-** OLIVEIRA, R. V. *Métodos para a Análise de Antibióticos Cefalosporínicos em Leite Bovino, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Multidimensional, com Injeção Direta de Amostras*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 35, 38 p.

**116-** GISCH, D.J.; HUNTER, B.T. and FEIBUSH, B. “Shielded Hydrophobic Phase: A New Concept for Direct Injection Analysis of Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography”. *J. Chromatogr.*, **433**: 264-268, 1988.

**117-** FRIED, K. and WAINER, I.W. “Column-Switching Techniques in the Biomedical Analysis of Stereoisomeric Drugs: Why, How and When”. *J. Chromatogr. B*, **689**: 91-104, 1997.

**118-** CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; WAINER, I. W. “Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography”. *Chirality*, **14**: 731-735, 2002.

**119-** CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M.; PEDRAZOLLI Jr, J. “Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatogr. B*, **766**: 153-160, 2002.

**120-** LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M. & CASS, Q. B. “Desenvolvimento de Colunas Cromatográficas de Meios de Acesso Restrito Proteína-Imobilizada e suas Avaliações para Análise de Fármacos com Injeção Direta de Plasma Humano” *Química Nova* **29 (1)**: 72-78, 2006.

**121-** De PAULA, F.C.C.R.; De PIETRO, A.C.; CASS, Q.B. “Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up”. *Journal of Chromatography A*, in press-DOI10.1016/j.chroma.2007.08.046, 2007.

**122-** BELAZ, K.R.A. *Quantificação dos Metabólitos do Albendazol em Plasma Bovino por Cromatografia Líquida Quiral de Alta Eficiência, com Injeção Direta de Amostra*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado, 99 p.

**123-** PEREIRA, A. V., CASS, Q. B. “High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean up column” *Journal of Chromatography B*, **826**, 139-146, 2005.

**124-** SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L. “Restricted Access Materials and Large Particle Supports for On-Line Sample Preparation: an

Attractive Approach for Biological Fluids Analysis” *Journal of Chromatography B*, **801**: 141-156, 2004.

**125-** MULLETT, W. M. “Determination of Drugs in Biological Fluids by Direct Injection of Sample for Liquid-Chromatographic Analysis” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**: 263-273, 2007.

**126-** ANDERSON, D.J. “High-Performance Liquid Chromatography in Clinical Analysis”. *Anal. Chem.*, **71**: 314R-327R, 1999.

**127-** FELIX, G.; CAMPÈSE, D. “Determination by HPLC of the Chiral Conversion of Drugs in Biologic Fluids on New RAM-CHIRAL Columns” *30<sup>th</sup> Internacional Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*. San Francisco-CA-USA, 2006, p. 170.

**128-** GELPI, E. “Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, **703**: 59-80, 1995.

**129-** MAURER, H. H. “Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology”. *Journal of Chromatography B*, **713**: 3-25, 1998.

**130-** NIESSEN, W. M. A. “State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography*, **858**: 179-197, 1999.

**131-** BRUINS, A. P. “Mechanistic aspects of electrospray ionization”. *Journal of Chromatography A*, **794**: 345-357, 1998.

**132-** TITATO, G. M. *Desenvolvimento de Metodologia para a Determinação de Pesticidas Seleccionados em um Sistema de Cromatografia em Fase Líquida Acoplado a Espectrometria de Massas (HPLC-MS): Comparação entre ESI e APCI*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos, 2004. Tese de Doutorado em Ciências: Química Analítica, 47 p.



**133-** MATUSZEWSKI, B. K. “Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis”. *Journal of Chromatography B*, **830**: 293-300, 2006.

**134-** FU, I.; WOOLF, E.J.; MATUSZEWSKI, B.K. “Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **18**: 347–357, 1998.

**135-** LITTLE, J. L.; WEMPE, M.F.; BUCHANAN, C.M. “Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma”. *Journal of Chromatography B*, **833**: 219–230, 2006.

**136-** GEORGI, K.; BOOS, K. S. “Control of Matrix Effects in Bioanalytical MS/MS using On-line Multidimensional Solid-Phase Extraction”. *LC-GC Eur.*, **17 (11a)**: 21-24, 2004.

**137-** LANE, S.; BOUGHTFLOWER, B.; MUTTON, I.; PATERSON, C.; FARRANT, D.; TAYLOR, N.; BLAXILL, Z.; CARMODY, C.; BORMAN, P. “Toward Single-Calibrant Quantification in HPLC. A Comparison of Three Detection Strategies: Evaporative Light Scattering, Chemiluminescent Nitrogen, and Proton NMR”. *Analytical Chemistry*, **77**: 4354-4365, 2005.

**138-** FRIES, H.E.; EVANS, C.A.; WARD, K.W. “Evaluation of evaporative light scattering detection for metabolite quantification without authentic analytical standards or radiolabel”. *Journal of Chromatography B*, **819**: 339–344, 2005.

**139-** HERON, S.; MALOUMBI, M.G.; DREUX, M.; VERETTE, E.; TCHAPLA, A. “Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporative-scattering detector”. *Journal of Chromatography A*, **1161**: 152–156, 2007.

**140-** HSY, B.H.; ORTON, E.; TANG, S.Y.; CARLTON, R.A. “Application of evaporative light scattering detection to the characterization of combinatorial and parallel synthesis libraries for pharmaceutical drug discovery”. *Journal of Chromatography B*, **725**: 103–112, 1999.

**141-** PORTER, R.S.; CHEN, T.K. “Chromatographic analysis of mupirocin in polyethylene glycols 400 and 3350 using dual ultraviolet and evaporative light scattering detection”. *Journal of Chromatography A*, **732**: 399–402, 1996.

**142-** BRADFORD, M.M. “A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254, 1976.

**143-** ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. “Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes”. *Quimica. Nova*, **21 (6)**: 787-793, 1998.

**144-** COMPTON, S. J. & JONES, C. G. “Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay”. *Anal. Biochem.*, **151**: 369-374, 1985.

**145-** BORDIN, G.; RAPOSO, C. F.; CALLE, B.; RODRIGUEZ, A. R. “Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography”. *Journal of Chromatography*, **928**: 63-76, 2001.

**146-** SCHMDIT Jr., D. E.; GIESE, R. W.; CONRON, D.; KARGER, B. L. “High performance liquid chromatography of proteins on a diol-bonded silica gel stationary phase”. *Anal. Chem.*, **52**: 177-82, 1980.

**147-** DANSON, M. J.; HOUGH, D. W. “The structural basis of protein halophilicity”. *Comp. Biochem. Physiol.*, **117A**: 307-12, 1997.

**148-** CASS, Q. B.; GOMES, R. F.; CALAFATTI, S. A.; PEDRAZOLLI, J. “Determination of amoxicillin in human plasma by direct

injection and coupled-column-high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A*, **978**: 235-241, 2003.

**149-** LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. “High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice”, 1<sup>st</sup> edition, Blackie Academic & Professional, Glasgow, p. 52-75, 1995.

**150-** DIONEX. “Methods Development Using Ion-Pair Chromatography with Suppressed Conductivity Detection”, Technical Note 12.

**151-** FRITZ, J. S. “Factors affecting selectivity in ion chromatography”. *Journal of Chromatography A*, **1085**: 8-17, 2005.

**152-** DAI, J.; CARR, P. W. “Role of ion pairing in anionic additive effects on the separation of cationic drugs in reversed-phase liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A*, **1072**: 169-184, 2005.

**153-** MIGUEL, I.; SAMAIN, D. “Use of mixed perfluorinated ion-pairing agents as solvents in ion-pair high-performance liquid chromatography for the preparative purification of aminoglycoside antibiotics”. *Journal of Chromatography*, **407**: 109-119, 1987.

**154-** BRUIJNSVOORT, M. V.; OTTINK, S. J. M.; JONKER, K. M.; BOER, E. “Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry”. *Journal of chromatography A*, **1058**: 137-142, 2004.

**155-** ADAMS, E.; RAFIEE, M.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. “Liquid chromatographic analysis of streptomycin sulfate”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **24**: 219-226, 2000.

**156-** KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; KÖLBENER, P. “Trace level quantification of streptomycin in honey in liquid chromatography/tandem mass spectrometry”. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **17**: 2575-2577, 2003.

**157-** Anvisa. Resolução – RE nº 899 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

**158-** CLAROT, I.; REGAZZETI, A.; AUZEIL, N.; LAADANI, F.; CITTON, M.; NETTER, P.; NICOLAS, A. “Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection”. *Journal of Chromatography A*, **1087**: 236-244, 2005.

**159-** The United States Pharmacopoeia and The National Formulary, USP 23, NF 18, p. 702, 1995.

**160-** OERTEL, R.; NEUMEISTER, V.; KIRCH, W. “Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum”. *Journal of Chromatography A*, **1058**: 197-201, 2004.

**161-** OERTEL, R.; RENNER, U.; KIRCH, W. “Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 633-638, 2004.

**162-** LOFFLER, D.; TERNES, T. A. “Analytical method for the determination of aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 583-588, 2003.

**163-** ROGATSKY, E.; STEIN, D. “Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development”. *J Am Soc Mass Spectrom*, **16**: 1757-1759, 2005.

**164-** LARGER, P. J.; BREDA, M.; FRAIER, D.; HUGHES, H.; JAMES, C. A. “Ion-suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery

bioanalysis”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**: 206-216, 2005.

**165-** KOSTER, E.; RINGELING, P.; OOMS, B. “Denaturing Solid-Phase Extraction for Reduced Protein Interference in Bioanalytical SPE-LC-MS”. *LC-GC Europe – the applicationsbook*, Setembro de 2002.

**166-** HAGER, J. W., “Recent trends in mass spectrometer development”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 845-850, 2004.

**167-** ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. “Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation”. *Journal of Chromatography A*, **1158**: 111-125, 2007.