



MÉTODO DE ANÁLISE DE FLORFENICOL E FLORFENICOL AMINA EM ÁGUA POR INJEÇÃO DIRETA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Julia **Morandi**¹, Marley Mendonça **Tavares** ², Vera Lúcia **Ferracini**³

Nº 21410

RESUMO - Métodos para determinação de produtos sintéticos em amostras aquosas normalmente requerem várias etapas de preparação das amostras, como extração, clean up e concentração. Portanto é muito importante desenvolver métodos analíticos mais simples, mais econômicos e com baixo impacto ao meio ambiente. O objetivo foi testar um método para detecção multiresíduos de dois antibióticos baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (UPLC - ESI -MS/MS), operado em modo positivo de ionização para o florfenicol amina e modo negativo para o florfenicol, sem concentração e/ou clean up. O método por injeção direta e sem clean up além de conseguir economia de reagentes e solventes, minimiza o desperdício, o que resulta em vantagens no ponto de vista ambiental. Os limites de quantificação para o florfenicol e florfenicol amina foram $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A resposta de dois íons no modo MRM foi monitorada com injeção direta de $10 \mu\text{L}$ e tempo de corrida de 3 min. As curvas de calibração foram lineares para os dois compostos com recuperação de 84% a 102 % e desvio padrão relativo de $\leq 20\%$.

Palavras - chaves: Detecção de antibiótico, resíduos em água, injeção direta, cromatografia líquida de ultra eficiência.

¹ Autor, Bolsista CNPq: Graduação em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Tecnologia, Campinas-SP; juliamorandi.77@gmail.com

² Técnico - Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

³ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; vera.ferracini@embrapa.br



ABSTRACT - *Methods for determining synthetic products in aqueous samples typically require several steps of sample preparation such as extraction, clean up, and concentration. Therefore, it is especially important to develop analytical methods that are simpler, more economical, and more environmentally friendly. The objective was to test a method for multiresidue detection of two antibiotics based on liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC - ESI - MS/MS) operated in positive ionization mode for florfenicol amine, and in negative mode for florfenicol, without concentration and /or clean up. Besides providing savings in reagents and solvents, the method by direct injection and without clean up minimizes waste, which results in an environmental advantage. The limits of quantification for florfenicol and florfenicol amine were $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The response of two ions in MRM mode was monitored with direct injection of $10 \mu\text{L}$ and a running time of 3 min. Calibration curves were linear for the two compounds with recovery rate of 84% to 102 %, and relative standard deviation of $\leq 20\%$.*

Keywords: Antibiotic detection, residues in water, direct injection, ultra efficient liquid chromatography.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o sistema de produção agropecuário que mais cresce no mundo e apresenta grande potencial de expansão devido à busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis (SEBRAE, 2015). O pescado é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, proporcionando uma dieta saudável, com alto valor proteico, rica em vitaminas A, B12, C e D e ácidos graxos poliinsaturados de boa qualidade, como o ômega-3 (PROTEÍNAS, 2009). O processo de cultivo intensivo vem sendo realizado para suprir essa grande demanda de produção de peixes. A criação intensiva de peixes em tanques rede tem sido uma prática comum e para controlar infecções bacterianas são rotineiramente empregados os antimicrobianos, entre esses o florfenicol (FFC), um dos únicos antimicrobianos permitido pela legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2010).

O FFC é um antimicrobiano sintético de amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação do FFC se dá pela ligação à subunidade



ribossômica bacteriana 50S e inibição da síntese de proteínas no estágio da peptidiltransferase (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2018). O produto veterinário contendo florfenicol comercializado no Brasil pela Shering Plough, o Aquaflor® 50% Premix, é indicado para o tratamento da septicemia hemorrágica bacteriana, causada pela bactéria *Aeromonas* sp e para a estreptococose, causada pela bactéria *Streptococcus agalactiae* em espécies de tilápia e seus híbridos (LIM *et al.*, 2010).

O FFC é frequentemente administrado por via oral, através da ração medicada e pode ser lixiviado da ração para a água ou, até mesmo, quando usado durante o transporte de peixes para a prevenção de infecções. Embora sua degradação seja relativamente rápida e não apresente potencial de bioacumulação, o uso recorrente garante sua presença nos canais aquíferos, podendo provocar danos no ecossistema aquático e favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes (BARRETO, 2018).

Métodos para a determinação de pesticidas e antibióticos em amostras aquosas normalmente requerem várias etapas de preparação das amostras, como extração, *clean up* e concentração. Atualmente o foco é no desenvolvimento de métodos analíticos econômicos e com baixo impacto ao meio ambiente (ASSALIN *et al.*, 2017)

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método sensível, rápido e robusto para detecção de dois antibióticos, em água, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (UPLC - ESI -MS/MS), por meio de injeção direta de amostra, sem concentração da amostra e/ou *clean up*, baseado no método descrito por ASSALIN *et al.* (2017).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Soluções padrões

O padrão analítico de florfenicol (FFC) foi adquirido da empresa Dr. Ehrenstorfer, com grau de pureza de 99,8% e o padrão de florfenicol amina (FFA) foi adquirido da Sigma-Aldrich, com grau de pureza 99,8%. As soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas em metanol na concentração de 1000 µg mL⁻¹ para florfenicol e 60 µg mL⁻¹ para florfenicol amina. Estas soluções são armazenadas em frascos e mantidas em freezer a temperatura de -20 °C, por até um ano. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição apropriada das soluções e armazenadas em freezer à -20 °C, por até 10 dias.



As curvas analíticas de calibração com o florfenicol foram construídas nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 e 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o florfenicol amina, foram utilizadas as concentrações de 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 e 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2. Equipamento

As amostras de água contendo a mistura dos padrões foram previamente filtradas em Millex GV de 0,22 μm de poro diretamente no vial de injeção. O florfenicol (FFC) e florfenicol amina (FFA) foram analisados no cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas triploquadrupolo com fonte de ionização electrospray (UPLC-ESI-MS/MS), Quattro Premier XE, Waters. O sistema de aquisição de dados utilizou o software Masslynus 4.1 (Waters) em modo positivo para FFA e negativo para FFC, sem concentração e/ou clean up. Os parâmetros utilizados foram capilar 2 KV para FFC e 3 KV para FFA, extrator 3,0 V, temperatura da fonte 120°C, temperatura e fluxo do gás de dessolvatação (N_2) 460°C e 500 L.H^{-1} , respectivamente. Argônio foi utilizado como gás de colisão com fluxo de 0,2 mL.min^{-1} . A fase móvel utilizada foi água contendo ácido fórmico 0,01 % (A): acetonitrila (B) na proporção (30:70) no modo isocrático, vazão de 0,4 mL. min^{-1} , totalizando 3 minutos de corrida. A coluna utilizada foi Acquity UPLC BEH C18 - 2,1 x 50 mm, 1,7 μm (Waters) e volume de injeção de 10 μL . O espectrômetro de massas foi operado em modo MS/MS, com monitoramento de reações múltiplas (MRM) e duas transições para cada antibiótico.

2.3. Validação do método

A validação foi conduzida para determinar a linearidade e sensibilidade, representada pelos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) e precisão, baseada nos parâmetros e critérios estabelecidos em EURL (2020) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2020). A linearidade foi determinada pela análise em sextuplicata dos padrões analíticos FFC e FFA, compreendidos entre 0,005 - 0,02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para estabelecerem os coeficientes de determinação ($\text{RSD}\%$) para cada analito.

O limite de detecção do método (LD), menor concentração que pode ser detectado pela técnica instrumental, foi estabelecido como sendo o primeiro ponto da curva analítica. O limite de quantificação (LQ), a mais baixa concentração que pode ser quantificada, foi determinada por meio de ajuste numérico das curvas analíticas. Os valores de LQs correspondem à concentração



estimada onde o coeficiente de variação (CV) das médias das áreas, de seis repetições, foi de 20%. A eficiência do método foi investigada por meio de estudos de recuperação das amostras fortificadas em 0,02, 0,04 e 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o FFC e 0,01; 0,02; 0,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para FFA, com cinco replicatas. O critério adotado foi recuperação de 70% a 120% e coeficiente de variação <20%.

A precisão intra-dia (repetibilidade, RSD) foi obtida com três replicatas em três concentrações diferentes e, analisadas no mesmo dia pelo mesmo analista. A precisão inter-dia foi obtida com três replicatas em três concentrações diferentes analisadas em dois dias diferentes, pelo mesmo analista.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois mais abundantes íons precursores e seus fragmentos foram selecionados em função da otimização das condições cromatográficas, bem como da otimização dos parâmetros de massas, em MRM. Na Tabela 1 são apresentados as transições e os tempos de retenção monitorados para os dois antibióticos florfenicol e florfenicol amina.

Tabela 1. Transições e tempos de retenção dos íons monitorados do FFC e FFA

Antibiótico	Transição 1 Confirmação	Transição 2 Quantificação	Tempo de retenção Tr (min)
Florfenicol (FFC)	356 >184,8	356 >335,8	0,44
Florfenicol Amina (FFA)	248 >130	248 >230	0,33

As curvas de calibração mostraram-se lineares no intervalo de trabalho estudado apresentando r superiores ou próximos de 0,99, como recomendado pela Comunidade Europeia (EC, 2002) e pelo BRASIL (2011), conforme apresentadas na Figura 1.

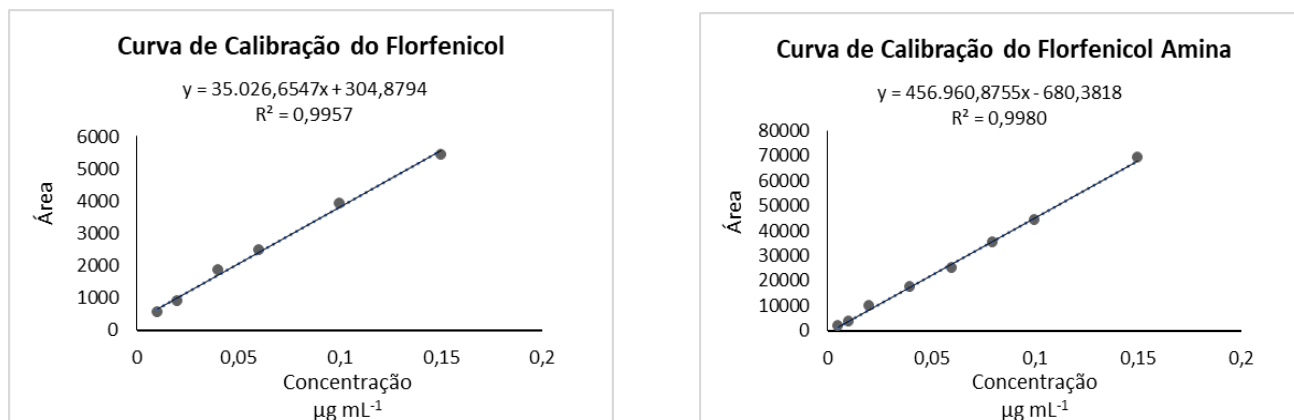


Figura 1. Curvas de calibração do florfenicol e florfenicol amina

Sob as condições otimizadas, as recuperações para os dois analitos variaram na faixa de 84% a 102%, as quais estão dentro da faixa recomendada pela AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2020) e o Guia EURL (2020). Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros de validação para florfenicol e florfenicol amina, para as precisões intra-dia e inter-dia, em três replicatas, em três níveis de concentração.

Tabela 2. Parâmetros de validação para Florfenicol e Florfenicol Amina em água

Parâmetros	Florfenicol			Florfenicol Amina		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,02	0,04	0,06	0,01	0,02	0,04
Precisão intra-dia (RSD%)	19	14	4	5	9	4
Precisão inter-dia (RSD%)	11	6	3	7	8	4
Recuperação (%)	84	102	100	90	91	97

Na Tabela 3 são apresentados os limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e o coeficiente de variação (CV %) dos antibióticos. Os valores do coeficiente de variação obtidos estão abaixo do valor permitido < 20 % (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020; EURL, 2020).



Tabela 3. Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Coeficiente de Variação (CV) para florfenicol e florfenicol amina.

Antibiótico	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)
Florfenicol (FFC)	0,01	0,02	13
Florfenicol Amina (FFA)	0,005	0,01	9

4. CONCLUSÃO

O método para determinação de florfenicol e florfenicol amina em água por injeção direta, sem concentração e/ou clean up mostrou ser simples por não requerer a etapa de preparo da amostra. Esse método também economizou no uso de reagentes e solventes, minimizando seu descarte para o meio ambiente. Os resultados obtidos revelaram a sensibilidade, rapidez, baixo custo e confiabilidade do método. O emprego desse método será útil nas análises das águas, oriundas dos estudos de tilápias alimentadas com ração medicada com florfenicol.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Tecnológica e Industrial (ITI-A).

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **PARA** – Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>>. Acesso em: 01 ago. 2021.

ASSALIN, M. R. *et al.* Multioresíduos de pesticidas em água por injeção direta e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. In: CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS, 8., 2016, Espanha. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2017. 4 p.

BARRETO, F. M. **Veículos para recobrimento de ração medicada para peixes: impactos na liberação do florfenicol e digestibilidade aparente da ração medicada em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2018. 142p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, SP.



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica para fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos Veterinários**. Brasília DF: MAPA/ACS, 2011. 72 p. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2021.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, DF: MPA 2010. 129 p. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2010_nac_boletim.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Manual Técnico: Biossegurança e resposta a emergência sanitária para a produção de animais de aquicultura**. 80 p., 2018. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/bibliotecas/manual_tecnico_-_biosseguridade_sanitaria.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

EURL. **Residues of Pesticides**. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. New Update (01.01.2020): Document No. SANTE/12682/2019. Disponível em: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727>. Acesso em: 11 ago 2021.

LIM, J. H. *et al.* Plasma and tissue depletion of florfenicol in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) after oral administration. **Aquaculture**, v.307, n.1-2, p. 71–74, 2010.

PROTEÍNAS do peixe. **Food Ingredients Brasil**, v. 8, p. 23-32, 2009.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Aquicultura no Brasil: Série de estudos mercadológicos**. Brasília, Distrito Federal. p. 6-17. 2015.