

LETÍCIA GOMES MAGNAGO CALDEIRA

**“PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM OVOS E
VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUOS QUALITATIVO E
CONFIRMATÓRIO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL”**

Tese apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, área de Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Prof^ª. Silvana de Vasconcelos Cançado.

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
Belo Horizonte - MG
2012

C146p Caldeira, Letícia Gomes Magnago, 1971-
Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial / Letícia Gomes Magnago Caldeira. – 2012.
138 p. : il.

Orientador: Silvana de Vasconcelos Caçado
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Ovos – Análise – Teses. 2. Resíduos de antibióticos – Teses. 3. Cromatografia líquida – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. 5. Antimicrobianos – Teses.
I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.5

Dedico este trabalho à vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir caminhar sempre sem desistir diante dos obstáculos que a vida me apresenta.

A minha família (pai, mãe e irmão) pela formação e constante estímulo ao estudo.

Ao Márcio, agradeço a paciência, o apoio, a compreensão e o carinho, sempre.

Aos amigos e colegas do LRM, em especial a Flávio Alves Santos pelas palavras de incentivo, ensinamentos, paciência e amizade e por compartilharem comigo esse caminho, contribuindo, direta e indiretamente, para que eu concluísse esta tese.

À professora e orientadora Silvana de Vasconcelos Caçado, pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos coorientadores e professores Nelson Carneiro Baião e Leonardo José Camargos Lara pelo apoio e compreensão.

À comissão avaliadora, professor Nelson Rodrigo da Silva Martins, professora Lílian Viana Teixeira, Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira, Dra. Cristiana Perdigão Rezende por aceitarem participar da banca examinadora, pela cooperação, sugestões e ensinamentos.

Ao professor Leonardo Lara, alunos e funcionários da Fazenda Experimental da escola de Veterinária da UFMG pelo auxílio na execução do experimento “in vivo”.

Ao Colegiado de Pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG pelo suporte durante todas as etapas do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudos.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG) por permitir e apoiar a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal, na pessoa da Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira pelo apoio na execução da parte experimental.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!
Letícia

**Na vida,
Não vale tanto
O que temos.
Nem tanto importa
O que somos.**

**Vale o que realizamos
Com aquilo que possuímos.
E, acima de tudo, importa
O que fazemos de nós.**

Emmanuel.

SUMÁRIO

	Páginas
Capítulo I.	
1.	Introdução 19
2.	Revisão Bibliográfica 21
2.1	Uso de Medicamentos em Animais de Produção 21
2.1.1	Antimicrobianos 23
2.1.1.1	Beta-lactâmicos 29
2.1.1.2	Tetraciclinas 31
2.1.1.3	Sulfonamidas 32
2.1.1.4	Aminoglicosídeos 33
2.1.1.5	Macrolídeos e Lincosamidas 34
2.1.1.6	Quinolonas 34
2.2	Resíduos de Medicamentos Veterinários em Ovos 34
2.3	Legislação e Limites Máximos de Resíduos (LMR's) 35
Capítulo II.	
	Validação Intralaboratorial de Método Multirresíduos 40
	Resumo 40
	Abstract 40
1.	Introdução 41
2.	Revisão Bibliográfica 41
2.1	Análises de Resíduos de Antimicrobianos 41
2.1.1	Análises Físico-Químicas de Resíduos de Antimicrobianos 43
2.2	Validação de Métodos Analíticos 46
3.	Material e Métodos 47
3.1	Padrões, Soluções e Reagentes 47
3.2	Otimização dos Parâmetros Instrumentais 51
3.3	Procedimentos de Extração 51
3.4	Delineamento Experimental da Validação 54
3.5	Protocolo de Validação para Método Qualitativo 55
4.	Resultados e Discussão 59
4.1	Otimização dos Parâmetros Instrumentais e de Extração 59
4.2	Otimização dos Procedimentos de Extração 81
4.3	Validação para Método Qualitativo 84
5.	Conclusões 99

Capítulo III.

	Pesquisa de Resíduos de Antimicrobianos em Ovos	100
	Resumo	100
	Abstract	100
1.	Introdução	101
2.	Revisão Bibliográfica	101
2.1	Formação do Ovo e Resíduos de Medicamentos	101
2.2	Administração de Medicamentos e Período de Carência	105
2.3	Avaliação de Resíduos de Antimicrobianos em Ovos	108
3.	Material e Métodos	109
4.	Resultados e Discussão	111
5.	Conclusões	129
3.	Referências Bibliográficas	130
4.	Apêndice – Unidades de medida/Siglas e Abreviaturas	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência de princípios ativos e finalidade de uso dos medicamentos citados em 42 granjas de avicultura de postura no Estado do Paraná, no período de junho a outubro de 2004	28
Tabela 2 -	Compilação dos limites de referência estabelecidos em ovos segundo o Regulamento (CEE) Nº 37/2010 da União Europeia e demais informações pertinentes ao uso de antimicrobianos para poedeiras comerciais	38
Tabela 3 -	Antimicrobianos e seus respectivos Limites de Referência estabelecidos pelo <i>Codex Alimentarius</i>	39
Tabela 4 -	Antimicrobianos e seus respectivos Limites de Referência estabelecidos pelo Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para a matriz ovo no ano de 2011	39
Tabela 5 -	Informações referentes aos padrões de antimicrobianos para o preparo das soluções padrões utilizadas na validação do método multiresíduos	47
Tabela 6 -	Concentração dos analitos e alíquotas das soluções estoque e intermediária utilizadas no preparo da solução de adição e concentração final do analito na solução de adição, utilizada no processo de extração por ácido tricloroacético - TCA	49

Tabela 7 -	Concentração dos analitos e alíquotas das soluções estoque e intermediária utilizadas no preparo da solução de adição e concentração final do analito na solução de adição, utilizada no processo de extração por acetonitrila - ACN	49
Tabela 8 -	Limite de referência dos analitos estabelecido para a validação do método multirresíduos executada em dois níveis de concentração	54
Tabela 9 -	Gradientes das fases móveis em função do tempo de corrida utilizados na validação do método multirresíduos, empregando extração por acetonitrila (ACN) e por ácido tricloroacético (TCA)	59
Tabela 10 -	Transições MRM e condições espectrométricas utilizadas para cada analito extraído pelo método de ácido tricloroacético com base no método de referência e após os testes de otimização	60
Tabela 11 -	Transições MRM e condições espectrométricas utilizadas para cada analito extraído pelo método de acetonitrila com base no método de referência e após os testes de otimização	61
Tabela 12 -	Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas dos íons usando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas	62
Tabela 13 -	Determinação e avaliação da intensidade relativa dos íons estudados para os analitos extraídos por ácido tricloroacético, segundo os valores de tolerância máximos definidos pela Decisão 2002/657/CE	62
Tabela 14 -	Determinação e avaliação da intensidade relativa dos íons estudados para os analitos extraídos por acetonitrila, segundo os valores de tolerância máximos definidos pela Decisão 2002/657/CE	63
Tabela 15 -	Percentual de intensidade relativa dos íons estudados para a ampicilina ao longo dos três diferentes momentos do processo de validação – extração por acetonitrila	67
Tabela 16 -	Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por ácido tricloroacético validados em 0,75 da concentração alvo de triagem	85
Tabela 17 -	Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por ácido tricloroacético validados na concentração alvo de triagem	86
Tabela 18 -	Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por acetonitrila validados em 0,75 da concentração alvo de triagem	88
Tabela 19 -	Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por acetonitrila validados na concentração alvo de triagem	89

Tabela 20 -	Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo dos aminoglicosídeos e da lincomicina validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem	91
Tabela 21 -	Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo das tetraciclinas validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem	92
Tabela 22 -	Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo das quinolonas validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem	92
Tabela 23 -	Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo das sulfonamidas validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem	93
Tabela 24 -	Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo dos macrolídeos e para a clindamicina validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem	94
Tabela 25 -	Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo dos beta-lactâmicos validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem	95
Tabela 26 -	Resultados encontrados para os analitos na validação realizada na concentração alvo de triagem	96
Tabela 27 -	Resultados encontrados para os analitos na validação realizada em 0,75 da concentração alvo de triagem	97
Tabela 28 -	Dados compilados da literatura sobre a presença de resíduos de medicamentos em clara e gema	104
Tabela 29 -	Perfil de resíduos de oxitetraciclina e doxiciclina em ovos, após tratamento de galinhas poedeiras, e acompanhamento da eliminação do resíduo no ovo após a retirada do medicamento	107
Tabela 30 -	Transições e tempo de retenção dos antimicrobianos utilizados no experimento “in vivo” e pesquisados nas amostras de ovos	111
Tabela 31 -	Médias das razões entre as áreas das seis repetições obtidas a partir das respostas analíticas geradas pelas amostras do experimento “in vivo”	111
Tabela 32 -	Médias das razões entre áreas das amostras do tratamento 2 para todos os dias do período experimental	118
Tabela 33 -	Médias das razões entre áreas das amostras do tratamento 3 e 4 para todos os dias do período experimental	120

Tabela 34 -	Médias de razão entre áreas das amostras do tratamento 5 para todos os dias do período experimental	125
-------------	---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química dos antimicrobianos	24
Figura 2 -	Mecanismo de ação de antimicrobianos	26
Figura 3 -	Utilização de antimicrobianos em galinhas poedeiras como medicamento profilático, citados em 42 granjas no Estado do Paraná, de junho a outubro de 2004	29
Figura 4 -	Utilização de antimicrobianos em galinhas poedeiras como medicamento terapêutico, citados em 42 granjas no Estado do Paraná, de junho a outubro de 2004	29
Figura 5 -	Reação de epimerização da clortetraciclina	32
Figura 6 -	Esquema de um equipamento do tipo triplo quadrupolo	44
Figura 7 -	Representação esquemática dos procedimentos de extração empregados na validação do método multirresíduos	53
Figura 8 -	Representação do T_{valor} e do Fator de Corte - F_c	56
Figura 9 -	Representação esquemática do delineamento experimental da validação e do número total de amostras por método de extração	58
Figura 10 -	Cromatogramas das três transições da amoxicilina quando injetada no <i>pool</i> de analitos sem a presença da matriz ovo (a) e com a presença da matriz ovo (b)	65
Figura 11 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, das três transições da amoxicilina quando injetada no <i>pool</i> de analitos sem a presença da matriz ovo	65
Figura 12 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, das três transições da amoxicilina na presença de matriz ovo	66
Figura 13 -	Cromatogramas gerados por diferentes amostras, injetadas no equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas, em um mesmo dia de validação para a ampicilina	68

Figura 14 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, de todos os analitos extraídos pelo ácido tricloroacético (a) e da primeira transição dos analitos flumequina (b), ácido oxolínico (c) e ácido nalidíxico (d)	69
Figura 15 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos espectinomicina (a), enrofloxacina (b), ciprofloxacina (c) e norfloxacina (d)	70
Figura 16 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos lincomicina (a), doxiciclina (b), tetraciclina (c) e sarafloxacina (d)	71
Figura 17 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos gentamicina (a), clortetraciclina (b), tobramicina (c) e oxitetraciclina (d)	72
Figura 18 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos dihidroestreptomicina (a), neomicina (b), ampicacina (c) e estreptomicina (d)	73
Figura 19 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos higromicina (a), apramicina (b), kanamicina (c) e clortetraciclina (d)	74
Figura 20 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, de todos os analitos extraídos pela acetonitrila (a) e da primeira transição dos analitos sulfatiazol (b), sulfametoxazol (c), e sulfadiazina (d)	75
Figura 21 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos sulfametoxipiridazina (a), sulfametazina (b), sulfisoxazole (c) e sulfamerazina (d)	76
Figura 22 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos sulfaclorpiridazina (a), sulfadimetoxina (b), sulfadoxina (c) e sulfaquinoxalina (d)	77
Figura 23 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos penicilina G (a), amoxicilina (b), penicilina V (c) e ampicilina (d)	78
Figura 24 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos oxacilina (a), clindamicina (b), espiramicina (c) e nafcilina (d)	79
Figura 25 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos cloxacilina (a), eritromicina (b), dicloxacilina (c) e cefazolina (d)	80

Figura 26 -	Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos tilmicosina (a), tylosina (b) e sulfafenazol (c)	81
Figura 27 -	Cromatograma gerado pela injeção de amostra branca de matriz ovo extraída por ácido tricloroacético (TCA) e fortificada com o padrão interno (sulfafenazol)	82
Figura 28 -	Cromatograma gerado pela injeção de amostra branca de matriz ovo extraída por acetonitrila (ACN) e fortificada apenas com o padrão interno (sulfafenazol)	82
Figura 29 -	Cromatograma gerado pela injeção de uma amostra de branco reagente – extração por ácido tricloroacético (TCA), sem a presença de matriz ovo e de padrão interno	83
Figura 30 -	Cromatograma gerado pela injeção de uma amostra de branco reagente – extração por acetonitrila (ACN), sem a presença de matriz ovo	84
Figura 31 -	Curva de crescimento folicular	102
Figura 32 -	Fotografia de um ovário de galinha intacto (centro superior) e dissecado com as diferentes fases de formação da gema	102
Figura 33 -	Cromatograma MRM de amostra de ovo com traços de lincomicina com concentração estimada entre o LD e LQ.	109
Figura 34 -	Cromatograma gerado pela injeção do medicamento usado no tratamento 1 para verificar a presença do princípio ativo (neomicina)	112
Figura 35 -	Cromatogramas das transições da neomicina gerados pela injeção do Controle Positivo contendo o pool de analitos (a) e do extrato da amostra do tratamento 1 (neomicina), dia 3, repetição A (b).	113
Figura 36 -	Cromatograma gerado por amostra do tratamento 1 (controle - ração sem antimicrobiano), do dia 5 do período experimental.	114
Figura 37 -	Cromatograma gerado pela amostra 16 do tratamento 1 (neomicina), no dia 5 do período experimental, repetição B	115
Figura 38 -	Cromatograma extraído para isolamento do analito do cromatograma gerado pela injeção do Controle Positivo	116
Figura 39 -	Cromatogramas gerados pela injeção no CL-EM/EM das amostras T2D2A (a) e T2D5D (b) para pesquisa de resíduos de lincomicina nos ovos	117

Figura 40 -	Cromatogramas gerados pelas amostras do tratamento 3, dia 3, repetição C (a) e tratamento 4, no dia 4, repetição D (b)	121
Figura 41 -	Cromatograma gerado pela amostra do tratamento 5, dia 5, repetição D	124
Figura 42 -	Cromatograma gerado pela amostra do tratamento 5, dia 4 do período experimental, repetição B (a). Pico da primeira transição da ciprofloxacina (b)	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação dos antimicrobianos por sua estrutura química, ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação	25
------------	---	----

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 -	Respostas das médias das repetições do tratamento 2 ao longo do período experimental	118
Gráfico 2 -	Estimativa da concentração das amostras do tratamento 2 (lincomicna) obtidas no experimento “in vivo”, ao longo do período experimental	119
Gráfico 3 -	Respostas das médias das repetições do tratamento 3 ao longo do período experimental	122
Gráfico 4 -	Respostas das médias das repetições do tratamento 3 ao longo do período experimental	122
Gráfico 5 -	Respostas das médias das repetições do tratamento 5 ao longo do período experimental	127
Gráfico 6 -	Respostas das médias das repetições das amostras do tratamento 5 para o analito ciprofloxacina ao longo do período experimental.	128

CAPÍTULO I

1. Introdução

O Brasil é, na atualidade, o segundo maior produtor mundial de *commodities* avícolas e o primeiro exportador de carne de frango. O sucesso da avicultura nacional é decorrência direta dos avanços tecnológicos ligados à seleção genética e ao manejo das aves. A cadeia produtiva de ovos no Brasil se caracteriza pela produção, para consumo *in natura* ou industrializados, com alta tecnologia por poedeiras comerciais criadas em gaiolas e por produtores independentes, de pequeno e médio porte, que preparam a própria ração na propriedade e trabalham com galpões abertos, tradicionais. Existem, também, grandes produtores que estão partindo para a adequação climática e automação das instalações.

A indústria avícola se caracteriza pela agregação contínua de novas tecnologias o que resulta em uma atividade com os mais destacados índices de produtividade entre os diversos segmentos da pecuária. O melhoramento genético das galinhas poedeiras, obtido por gerações de cruzamentos industriais, resultou em aves com produção de até 320 ovos no seu primeiro ciclo de postura de um ano. A galinha de postura moderna consegue transformar recursos alimentares de menor valor biológico em produto de alta qualidade nutricional para consumo humano. Essa eficiente transformação depende de fatores biológicos relacionados à fisiologia da ave, aliada a conhecimentos sobre o aporte nutricional necessário, manejo e ambiente adequados de criação.

Em 2007, a China foi a maior produtora de ovos, responsável por 41% da produção mundial, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Em segundo lugar ficaram os Estados Unidos, seguidos da Índia, Japão, México, Rússia e Brasil, que

ocupou o sétimo lugar. A produção do país atingiu 1.858 mil toneladas, um pouco mais de um terço da alcançada pelos Estados Unidos, mas muito distante da obtida pela China, que totalizou 25.654 mil toneladas (FAO, 2010). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de ovos em 2011 apresentou um aumento em relação a 2010, com 2,7 bilhões de dúzias, representando um crescimento de 4,3%.

A participação do Brasil como exportador mundial de ovos ainda é tímida, mas as exportações do produto apresentaram crescimento de 2004 a 2010. Embora tenha havido crescimento das exportações em 2009, com 45,3 mil toneladas embarcadas e um faturamento de US\$ 78,5 milhões, houve uma queda de 7,3% no faturamento, devido aos baixos preços no mercado internacional. Em 2011, as exportações brasileiras de ovos somaram 16,6 mil toneladas, o que representou redução de 39% em relação a 2010. As principais regiões de destino do ovo brasileiro foram a África, com 11,2 mil toneladas e o Oriente Médio, com três mil toneladas. Entre os países, os maiores compradores foram Angola e Emirados Árabes Unidos.

Mesmo com o crescimento da demanda dos últimos anos, no Brasil, esse crescimento não foi relevante, pois o brasileiro ainda consome pouco ovo quando comparado à média *per capita* mundial. Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF), em 2009, o consumo *per capita* foi o mesmo de 2008, ou seja, 120 unidades. Isso representa uma redução em relação às 132 unidades do ano de 2007 e às 142 do ano de 2006, o que já posicionava o Brasil bem abaixo de países como o México (375 unidades), o Japão (347 unidades) e os Estados Unidos (258 unidades). Mesmo na América Latina, não estamos entre os maiores consumidores. Em 2011, o Brasil chegou a 162,57 unidades,

contra 148,8 em 2010, com um crescimento de 9,2% no consumo de ovos.

Em 2011, os estados que concentraram a maior produção foram São Paulo (34,21% do total nacional, mais do que toda a região Sul, a segunda maior produtora depois da região Sudeste), Minas Gerais (11,95%) e Paraná (7,46%). Segundo o IBGE, os municípios que mais se destacam na produção de ovos de galinha foram Bastos (SP), na região de Marília, com 55% da produção paulista, Santa Maria de Jetibá (ES) e Itanhandu (MG).

A maior valorização das vantagens nutritivas e funcionais do ovo pelos consumidores depende da qualidade desses produtos que são oferecidos ao mercado, sendo aspecto de influência na aceitação, nos hábitos e decisões do consumidor final. Diversos fatores são citados na literatura para explicar o baixo consumo nacional do produto, tais como: tabus e preconceitos que ainda persistem, seja em relação a problemas de saúde ou ao fato do ovo ser visto como alimento para classes menos favorecidas; a baixa renda *per capita* da população (o que faz com que a participação na dieta de produtos industrializados à base de ovos, com maior valor agregado seja pouco significativa); hábitos alimentares diferenciados em relação aos países que figuram na lista de maiores consumidores e à reduzida organização desse segmento do setor produtivo, quando comparado ao setor de carnes.

O ovo, produto de uma eficiente transformação biológica, é reconhecidamente um importante contribuinte para a nutrição humana, pois na sua composição estão contidos os principais nutrientes necessários ao desenvolvimento físico. Desta forma, o seu consumo está diretamente relacionado à questão da segurança alimentar.

Segundo a norma NBR ISO 22000:2006 o termo “segurança de alimentos” descreve aspectos relacionados somente à inocuidade, ou seja, que os alimentos não se constituam perigos que possam causar danos à saúde, sejam eles agentes biológicos, físicos, químicos ou condição do alimento (ABNT, 2006). Segundo a FAO, segurança alimentar pode ser definida como o estado existente quando todas as pessoas, em todos os momentos, têm acesso físico e econômico a uma alimentação suficiente, segura e nutritiva capaz de atender às necessidades nutricionais e preferências alimentares. Produzir alimentos seguros, saudáveis e nutritivos e em bases sustentáveis e competitivas é um dos fundamentos da segurança alimentar. Deve-se garantir à população o acesso a alimentos imprescindíveis para a sua nutrição, o que inclui tanto a produção como o abastecimento e a comercialização.

A garantia da segurança alimentar e a redução de obstáculos ao comércio devem ser realizadas por um processo de harmonização das regulamentações sobre alimentos, padrões de qualidade e orientações normativas. Além disso, é importante o controle dos animais que dão origem a alimentos para o homem, que deve ser realizado por todos os países, tanto internamente quanto externamente, visando o estabelecimento de normas e legislações.

Grande parte da segurança alimentar repousa no controle de remanescentes residuais nos alimentos, em decorrência do uso de medicamentos veterinários, pesticidas ou contaminantes ambientais. O Brasil, pela posição que ocupa no mercado internacional, necessita desse controle, particularmente nos dias de hoje, onde essa prática é quase uma imposição no contexto do comércio internacional de produtos pecuários *in natura* e processados. A garantia da inocuidade dos alimentos ofertada ao consumo, quanto à presença de resíduos decorrentes do emprego de drogas

veterinárias, agroquímicos e contaminantes ambientais é possibilitada pelo controle de resíduos.

Na avicultura de postura a utilização de antimicrobianos nos programas sanitários preventivos e terapêuticos pode ocasionar no aparecimento de resíduos em ovos e a quantidade de resíduo presente permitida depende de estudos toxicológicos. Na prática são estabelecidos os Limites Máximos de Resíduos (LMR's) que são harmonizados internacionalmente ou criados pelo próprio país por meio de estudos do tempo de depleção do fármaco e a presença de metabólitos no produto. No entanto, faltam informações sobre o assunto na avicultura de postura o que dificulta o controle realizado pelos órgãos de fiscalização. Além disso, a disponibilidade de métodos analíticos sensíveis e exatos para monitorar a presença de resíduos de medicamentos veterinários é essencial para manter a inocuidade do produto.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram pesquisar a presença ou não de resíduos de antimicrobianos em ovos após o uso do medicamento na ração e verificar a presença ou não do resíduo após a suspensão da oferta da ração contendo o medicamento. Para tanto, foi necessário validar um método com a técnica cromatográfica acoplada à espectrometria de massas para a detecção e confirmação da presença desses resíduos na matriz ovo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Uso de Medicamentos em Animais de Produção

O crescimento cada vez maior da industrialização e o mercado globalizado exigem dos produtores rurais, notadamente nos últimos anos, a utilização de técnicas modernas na produção animal. Uma avicultura moderna pressupõe o conhecimento de novas tecnologias e de

novos padrões de concorrência, a busca incessante pela qualidade e a compreensão dos fatos que vêm sendo desencadeados pela movimentação dos circuitos financeiros gerados pela globalização da economia. No cenário mundial, o Brasil é considerado um dos líderes mundiais na produção de alimentos e, para manter essa posição e a abertura de novos mercados, frente à inexistência de medidas protecionistas e a falta de subsídios à agropecuária, os produtores devem buscar competência em suas atividades. O uso de ferramentas modernas e eficientes se torna imprescindível para a obtenção de produtos com qualidade e baixo custo de produção, quesitos considerados, nos dias de hoje, como fundamentais para que se possa enfrentar com sucesso as demandas dos mercados nacional e internacional. Contudo, essas modernas tecnologias tem resultado em uma dependência cada vez maior no uso de medicamentos veterinários durante as fases de produção, dentre os quais se destacam, pela relevância que têm, os antimicrobianos. Desta forma, grande parte das técnicas modernas de produção animal implica no uso de substâncias químicas, destacando-se os promotores de crescimento, como agentes que alteram a produção animal, e que atualmente, são definidos como aditivos zootécnicos (Palermo-Neto, 2011).

Desde a descoberta e o desenvolvimento dos primeiros antibióticos, antes da Segunda Guerra Mundial, essas drogas têm desempenhado um papel importante na medicina veterinária e humana (Doyle, 2006; Bondi et al., 2009) sendo usados desde 1950 como agentes antimicrobianos em animais de produção, como agentes profiláticos e terapêuticos e, também, como aditivos promotores de crescimento (Companyó et al., 2009). Na década de oitenta, estima-se que pelo menos 60% de todos os animais utilizados na produção de alimentos foram expostos a antimicrobianos

em algum momento de suas vidas (Bogialli, 2009).

O acesso sistemático, atualizado e confiável sobre o consumo de medicamentos veterinários e, em particular, de antibióticos, não é fácil, principalmente em países em desenvolvimento. Valores internacionais sobre o consumo de antibióticos são escassos e heterogêneos. Apesar do grande número e da diversidade dos grupos de antimicrobianos, alguns deles, por motivos de mecanismo de ação e custo, são mais utilizados que outros. O consumo total no mundo foi estimado entre 100.000 e 200.000 toneladas por ano. De acordo com a pesquisa realizada no ano 2000 pela Federação Europeia de Saúde Animal (FEDESA), 13.216 toneladas de antibióticos foram usadas na União Europeia. Kool et al. (2008) estimaram que na Europa, em 2004, foram utilizados 5.396 toneladas de antibióticos em medicina veterinária. Entre os mais usados estão tetraciclina, beta-lactâmicos e sulfonamidas. Em 2005, foram usadas na França 760 toneladas de antimicrobianos em medicina humana, predominando os beta-lactâmicos, e 1.320 toneladas em medicina veterinária, sendo as tetraciclinas os mais prescritos. Já em 2007, cerca de 12.650 toneladas de antimicrobianos, foram utilizados nos Estados Unidos sendo tetraciclinas responsáveis por 40% do total e 13% desses medicamentos foram utilizadas como promotores de crescimento. Em 2008, dados estimam que o uso de antibióticos em medicina veterinária, em 25 países da União Europeia, foi de 5.393 toneladas, com tetraciclinas, beta-lactâmicos e sulfonamidas sendo as classes mais utilizadas (Companyó et al., 2009). Dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) revelam que, em 2009, o setor brasileiro faturou mais de um bilhão de dólares com produtos veterinários e a indústria da Saúde Animal apresentou um crescimento real de 4% em 2010.

O uso de antimicrobianos em medicina veterinária se dá por finalidades mais amplas do que aquelas empregadas em medicina humana. Além do uso terapêutico e profilático os antimicrobianos são administrados na metafilaxia e como aditivos zootécnicos. O uso terapêutico do antimicrobiano se dá na ocorrência de doenças infecciosas do plantel e, na profilaxia, o seu uso é preventivo com o intuito de garantir proteção contra possível infecção (Spinosa & Tárraga, 2011). Quando um animal ou alguns animais do plantel apresentam sinais de doença infecciosa e emprega-se o antimicrobiano, em um curto prazo, com o objetivo de prevenir a instalação da doença em todo o plantel, diz-se do uso metafilático (Companyó et al., 2009). O uso metafilático é também chamado de tratamento de animais em risco ou tratamento de animais em contato. Dessa forma, o antimicrobiano pode ser administrado na ração ou água. Quando utilizados como aditivo zootécnico ou melhorador de desempenho objetiva-se reduzir a mortalidade, melhorar o crescimento e a conversão alimentar (Spinosa & Tárraga, 2011).

Segundo Doyle (2006), experimentos realizados há mais de 50 anos mostraram que níveis subterapêuticos de antibióticos poderiam aumentar a eficiência alimentar e o crescimento o que levou à incorporação generalizada de antibióticos em ração animal.

A avicultura moderna não pode prescindir do uso de antimicrobianos (Spinosa et al., 2005). Nos sistemas de produção usados no país, capazes de impor ao setor de produção uma dinâmica diferente, o convívio entre animais em espaços restritos, de mesma linhagem, idade, nas mesmas condições nutricionais e de higiene, alimentando-se da mesma ração, bebendo da mesma água e respirando o mesmo ar, possibilita o aparecimento de doenças que não serão restritas a um único indivíduo, mas, sim, a

toda a população animal. Esse fato tem graves consequências do ponto de vista de manejo, sanidade, mortalidade, rentabilidade do agronegócio e, principalmente, da qualidade do alimento produzido. Nesse contexto, o uso de antimicrobianos tem se tornado de extrema relevância (Palermo-Neto & Almeida, 2011).

2.1.1 Antimicrobianos

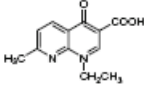
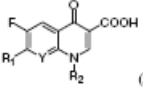
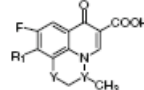
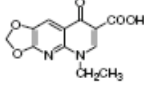
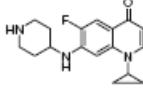
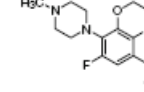
O termo antibiótico define substâncias químicas produzidas por microrganismos com capacidade de, em pequenas doses, inibir o crescimento ou eliminar o microrganismo (Walsh, 2003). Contudo, esse conceito foi ampliado para conceituar os antibióticos obtidos por síntese laboratorial. Dessa forma, define-se como antibiótico a substância produzida por microrganismos ou seu equivalente sintético com capacidade bacteriostática ou bactericida. As substâncias obtidas de culturas de microrganismos com a utilização de substâncias químicas capazes de alterar a estrutura molecular do antibiótico são chamadas de biossintéticos (penicilina V). Já os antibióticos semissintéticos são resultantes do acréscimo de radicais químicos ao núcleo ativo de um antibiótico isolado de um meio de cultura (oxacilina, ampicilina, amoxicilina). Atualmente, o termo antimicrobiano é usado para definir

substância que, em baixa concentração, exerce toxicidade seletiva sobre microrganismos patogênicos, independente da forma de obtenção (Brasil, 2009; Spinosa & Tárraga, 2011).

Os principais antimicrobianos usados em medicina humana e veterinária estão incluídos nas seguintes classes: beta-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, glicopeptídeos e ionóforos poliéster (Bondi et al., 2009).

Segundo Guimarães et al. (2010), os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos princípios ativos em uso clínico e podem ser beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc). Já os antibióticos de origem sintética seriam do grupo das sulfonamidas, das fluoroquinolonas ou uma oxazolidinona (linezolda).

A classificação dos antimicrobianos se dá por sua estrutura química (fig. 1), ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação (quadro 1).

QUINOLONAS /FLUOROQUINOLONAS		
First generation	Second generation (FLUOROQUINOLONAS)	Third generation (FLUOROQUINOLONAS)
 <p>Nalidixic acid</p>	 <p>(Bicyclic)</p>	 <p>(Tricyclic)</p>
 <p>Oxolinic acid</p>	 <p>Enrofloxacin</p>	 <p>Ofloxacin</p>

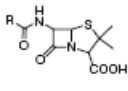
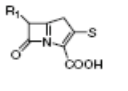
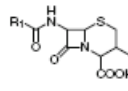
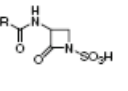
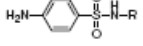
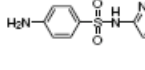
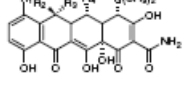
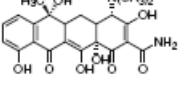
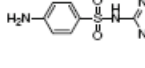
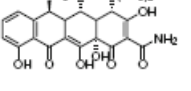
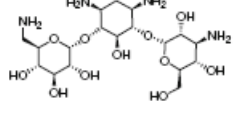
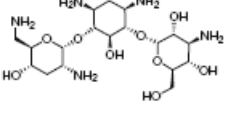
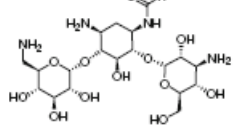
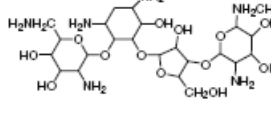
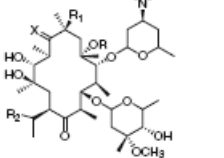
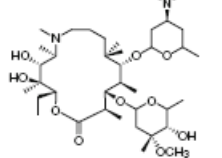
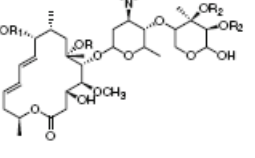
β-LACTAMS			
			
Penicillins	Carbapenems	Cephalosporins	Monobactams
SULFONAMIDES		TETRACYCLINES	
			
	Sulfisomidine		Tetracycline
			
	Sulfamethazine		Doxycycline
AMINOGLYCOSIDES			
			
Kanamycin A	Tobramycin		
			
Amikacin	Neomycin		
MACROLIDES			
			
Basic structure of 14-membered macrolides	Basic structure of 15-membered macrolides	Basic structure of 16-membered macrolides	

Figura 1 - Estrutura química dos antimicrobianos.

Fonte: Spinoso & Tárraga, 2011.

A estrutura química e o mecanismo de ação (fig. 2) são os critérios empregados para apresentar os diferentes grupos farmacológicos dos antibacterianos usados em medicina veterinária (Spinoso & Tárraga, 2011) sendo a classificação pelo

mecanismo de ação a de maior interesse na prática veterinária, mesmo não sendo um critério rígido, pois um mesmo antimicrobiano pode ser enquadrado em mais de um grupo (Spinoso et al., 2005).

Quadro 1 - Classificação dos antimicrobianos por sua estrutura química, ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação

Classificação	Antimicrobiano
Estrutura química - Derivados de aminoácidos - Derivados de açúcares - Derivados do acetato e propionato - Outros	Penicilinas**, cefalosporinas**, bacitracina, vancomicina, polimixinas Aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas Rifamicinas, anfotericina B, nistatina, tetraciclina** Fosfomicina
Origem - Produzidos por bactérias - Produzidos por ascomicetos - Produzidos por actinomicetos - Produzidos por síntese total ou parcial	Bacitracina, polimixinas Penicilinas**, cefalosporinas** Aminoglicosídeos, fosfomicina, lincosaminas, macrolídeos, cloranfenicol* Cloranfenicol*, fosfomicina, penicilinas**, semissintéticas (ampicilina, amoxicilina)**
Ação biológica - Bactericida - Bacteriostático - Fungicida - Fungistático	Penicilinas**, aminoglicosídeos Tetraciclina**, lincosamidas, macrolídeos anfotericina B, nistatina Griseofulvina
Espectro de ação - Ativos sobre bactérias gram-positivas - Ativos sobre bactérias gram-negativas - Amplo espectro - Ativos sobre micobactérias - Ativos sobre rickétsias, micoplasma e clamídias - Ativos sobre fungos	Penicilinas naturais**, macrolídeos, bacitracina Aminoglicosídeos, polimixinas Tetraciclina**, cloranfenicol*, rifampicina, ampicilina (penicilina semi-sintética) Aminoglicosídeos, rifampicina Tetraciclina, cloranfenicol*, macrolídeos Nistatina, anfotericina B, Griseofulvina
Mecanismo de ação - Parede celular - Membrana celular - Síntese de ácidos nucléicos - Síntese protéica	Penicilinas**, cefalosporinas**, fosfomicina, Bacitracina, vancomicina Polimixinas, anfotericina B Novobiocina, rifamicinas, Griseofulvina Aminoglicosídeos (formação de proteínas defeituosas), macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina**, cloranfenicol* (perturbação da tradução da informação genética)

Fonte: Adaptado de Spinoso et al., 2005.

Nota: * Uso proibido na terapêutica em animais produtores de alimentos (Brasil, IN 9/2003).

** Uso proibido como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (Brasil, IN 26/2009).

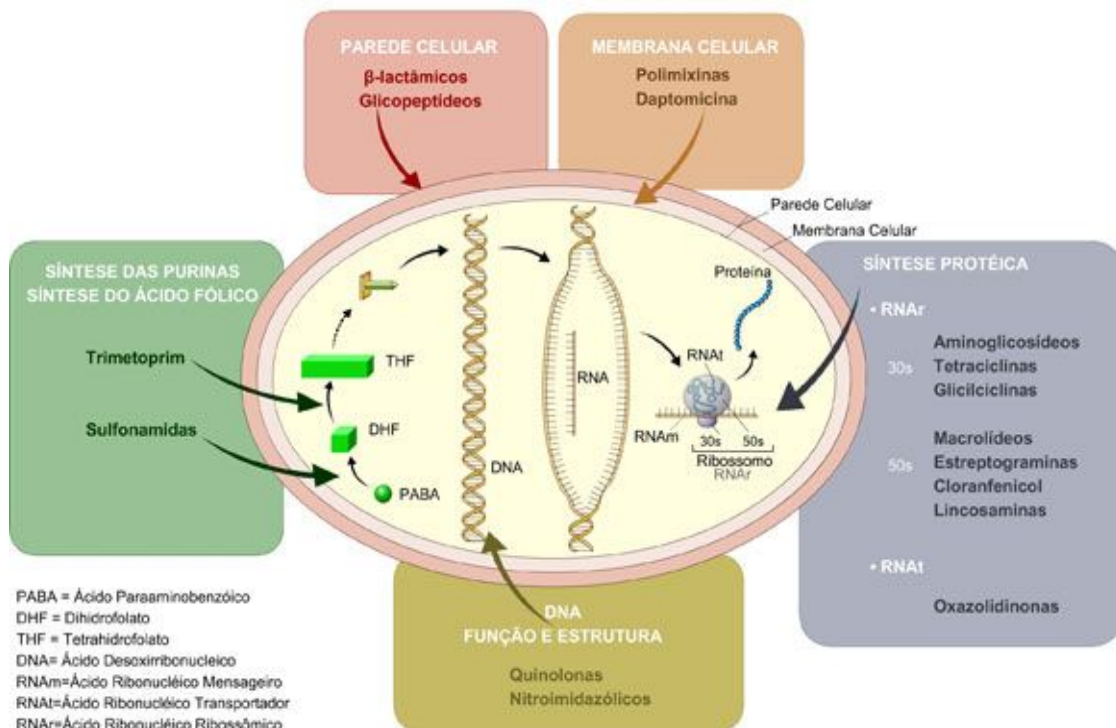


Figura 2 - Mecanismo de ação de antimicrobianos.
Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O uso de antimicrobianos específicos envolve conhecimentos da tríade: agente etiológico, princípio ativo e sua apresentação e o animal (hospedeiro:ave). Cada um dos componentes da tríade deve ser cuidadosamente analisado para a obtenção de sucesso no tratamento do processo infeccioso (Spinosa et al., 2005).

As aves que são tratadas com antimicrobianos devem receber atenção especial com o objetivo de impedir que possíveis resíduos dos mesmos sejam encontrados nos tecidos ou produtos derivados. Esses resíduos podem atingir a população por meio dos ovos ou da carne das poedeiras descartadas (Palermo-Neto, 2011).

A existência de legislação sobre substâncias farmacologicamente ativas constituintes dos medicamentos de uso veterinário aumentou a proteção do consumidor, mas também contribuiu significativamente para a

diminuição da disponibilidade de medicamentos passíveis de serem usados nos animais produtores de alimentos. Além disso, a sua elaboração conduziu a vários problemas relacionados com a implementação e aplicação das leis relacionadas com o controle dos resíduos nos alimentos de origem animal dificultando, conseqüentemente, o funcionamento do comércio internacional que depende da capacidade analítica dos laboratórios de cada Estado Membro. Vale ressaltar que uma substância autorizada num país pode ser classificada pela União Europeia como proibida tendo apenas como argumento a não existência de Limite Máximo de Resíduos estabelecido (Pinto, 2011).

Até meados dos anos 60 a ideia generalista de segurança alimentar significava que os alimentos não deveriam conter resíduos de medicamentos de uso veterinário prejudiciais à Saúde Pública. O objetivo era

realista, pois só se conseguiam detectar substâncias ativas em concentrações superiores a aproximadamente 1 mg.kg^{-1} . Os recentes avanços da química analítica, em relação à análise das substâncias químicas em produtos de origem animal, têm permitido a detecção de quantidades mínimas da ordem de partes por bilhão (ppb = $\mu\text{g.kg}^{-1}$) ou partes por trilhão (ppt = ng.kg^{-1}) de resíduos das mesmas (European Commission, 2003). No entanto, é necessário que se conheça não apenas que tipo de resíduo foi encontrado, mas, principalmente, a quantidade para que se julgue a segurança ou os riscos associados aos resíduos, pois certa quantidade de resíduo pode estar presente e não ser prejudicial à saúde humana. Para tanto, é imprescindível que os mesmos não sejam genotóxicos, ou seja, não interajam diretamente com material genético resultando em mutagênese e/ou carcinogênese, e seus níveis não excedam os LMR's fixados. Além disso, para os antimicrobianos em especial, exige-se que os resíduos não interfiram na microbiota do trato digestivo humano (Palermo-Neto, 2011).

A comunidade científica e as autoridades sanitárias, nos últimos 20 anos, discutem sobre o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos. A principal questão é saber se a resistência à antimicrobianos de importância humana que ocorrem em animais pode ser transmitida aos seres humanos. Como uma resposta a esta preocupação, todos os antibióticos promotores de crescimento foram proibidos na Suécia em 1986 e na Dinamarca em 1998. A União Europeia iniciou a proibição em 1997 e com o Regulamento (CE) 1831/2003 (European Commission, 2003) proibiu o uso de todos os antibióticos, com exceção dos coccidiostáticos, como aditivos para alimentação animal à partir de 01 de janeiro de 2006. Essa proibição tem restringido a importação dos produtos originados destes animais e influencia a

opinião de importantes importadores como os blocos asiáticos e o Oriente Médio (Santana et al., 2011). Em contraste, promotores de crescimento antimicrobianos continuam a ser autorizados nos Estados Unidos sob regulação e controle do Food and Drug Administration (FDA) (Companyó et al., 2009).

No Brasil, empregam-se 17 antimicrobianos como aditivos, contudo, existem aproximadamente 70 liberados para uso terapêutico, metafilático ou profilático. Segundo a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), os antimicrobianos autorizados para uso exclusivo em rações para galinhas poedeiras são bacitracina de zinco e bacitracina de metileno dissalicilato, sulfato de colistina, cloridrato de clorexidina, enramicina, halquinol (clorohidroxiquinolina) e fosfato ou tartarato de tilosina. Contudo, não há, para nenhuma dessas substâncias exigência quanto ao período de carência para liberação do produto para consumo (Brasil, 2008).

Todos os estabelecimentos fabricantes ou representantes de medicamentos e aditivos para uso em medicina veterinária, produzidos, importados, fracionados, comercializados no Brasil, devem ser registrados no setor competente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que é responsável por distribuir e coordenar recursos e ações relacionadas ao desenvolvimento do setor agropecuário brasileiro. A legislação do MAPA que regulamenta os quesitos necessários para se efetuar o registro de medicamentos ou aditivos para uso em avicultura é a mesma que regulamenta todos os outros setores da produção animal. Ou seja, não há uma legislação específica para os produtos utilizados na avicultura (Rosário, 2005).

Contudo, a legislação brasileira preconiza algumas medidas em relação ao uso dos antimicrobianos em medicina veterinária

considerando a importância do uso adequado no tratamento e na prevenção de doenças. O período de carência ou de retirada dos antimicrobianos, por exemplo, deve ser em conformidade com a forma, a fórmula e a via de administração do produto, devendo constar na bula, sempre que o antimicrobiano seja indicado para animais cujos derivados e subprodutos sejam destinados ao consumo humano (Brasil, 2009). Em alguns casos, os antimicrobianos utilizados em terapêutica devem ser evitados na indicação de aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais e, em outros, como é o caso do cloranfenicol, sua utilização é vedada na fabricação, na importação, comercialização e no emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares (Brasil, 2003).

Com o objetivo de avaliar o uso de medicamentos em animais produtores de alimento, o Ministério da Saúde implantou no Brasil, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (PAMvet). Em agosto de 2003, quando a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná criou o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR), foi realizada pesquisa em 66 granjas de galinhas poedeiras, localizada em regiões produtoras. Como agentes profiláticos usados nas granjas foram citados os seguintes produtos: olanquinox, enrofloxacina, bacitracina de zinco e tetraciclina. Como agentes terapêuticos estavam na lista: enrofloxacina, oxitetraciclina, norfloxacina, doxiciclina, sulfaquinoxalina, bacitracina de zinco, amoxicilina, apramicina, ciprofloxacina e a associação de doxiciclina com gentamicina, sendo que oxitetraciclina, enrofloxacina, olaquinox, norfloxacina, sulfaquinoxalina, doxiciclina, bacitracina de zinco e ciprofloxacina foram citadas como medicamentos utilizados na fase de postura.

As quinolonas foram os antimicrobianos com o maior número de citações de uso seguidas das tetraciclina e das quinoxalinas. Os princípios ativos mais observados foram: enrofloxacina (25,8%), oxitetraciclina (21,5%), olaquinox (15,1%), norfloxacina (9,7%), doxiciclina (6,5%), sulfaquinoxalina (6,5%) e bacitracina (6,5%).

Nas entrevistas realizadas foram mencionadas 44 marcas comerciais que, por repetições foram citadas 89 vezes. Nestas 44 marcas foram identificados 22 princípios ativos e entre os utilizados, os medicamentos usados na fase de postura foram citados 70 vezes (42,68%), seguidos pelos usados no tratamento de alterações patológicas, com 66 citações (40,24%) e, finalmente, os usados como profiláticos com 28 citações (17,07%), como pode ser observado na tab. 1 (Machinski Junior et al., 2005).

Tabela 1 - Frequência de princípios ativos e finalidade de uso dos medicamentos citados em 42 granjas de avicultura de postura no Estado do Paraná, no período de junho a outubro de 2004

Marcas	Princípio(s) Ativo(s)	Uso		
		Profilático	Terapêutico	Postura
01	Fluazuron		5	5
02	Amoxicilina		1	
03	Ampricilo	1		
04	Apramicina		1	
05	Deltametrina		6	6
06	Ciprofloxacina		1	1
07	Sulfaquinoxalina		3	3
08	Bacitracina de Zinco	2	2	2
09	Oxitetraciclina		1	1
10	Praziquantel	2		2
11	Doxiciclina		1	1
12	Doxiciclina		2	2
13	Doxiciclina + Gentamicina		1	
14	Enrofloxacina		2	2
15	Enrofloxacina		4	4
16	Enrofloxacina		2	
17	Enrofloxacina		1	
18	Enrofloxacina		1	1
19	Enrofloxacina			3
20	Enrofloxacina	3		
21	Flubendazol	1	1	1
22	Olaquinox	7		7
23	Ciromazina	3		3
24	Narasina	1	1	1
25	Mebendazol		1	
26	Mebendazol		2	2
27	Mebendazol	1		
28	Mebendazol		5	
29	Mebendazol	2	2	2
30	Nicarbazina	1		
31	Norfloxacina		1	1
32	Norfloxacina		3	3
33	Olaquinox + Bacitracina de zinco	1		
34	Norfloxacina		1	1
35	DDVP		1	1
36	Oxibendazole	1		1
37	Praziquantel		1	1
38	Avilamicina		3	3
39	Tetraciclina	1		
40	Oxitetraciclina	1		
41	Oxitetraciclina		1	1
42	Oxitetraciclina		7	7
43	Oxitetraciclina		1	1
44	Azamethiphós		1	1
Total de citações		28	66	70

Fonte: Machinski Junior et al., 2005.

Nota: foram citadas 44 marcas comerciais usadas como medicação profilática ou terapêutica, sendo que, em 70 citações, o uso de medicamentos ocorreu durante o período de postura das aves.

As figs. 3 e 4 apresentam os principais agentes utilizados como agentes profiláticos

e terapêuticos e seus respectivos percentuais de uso nas propriedades pesquisadas.

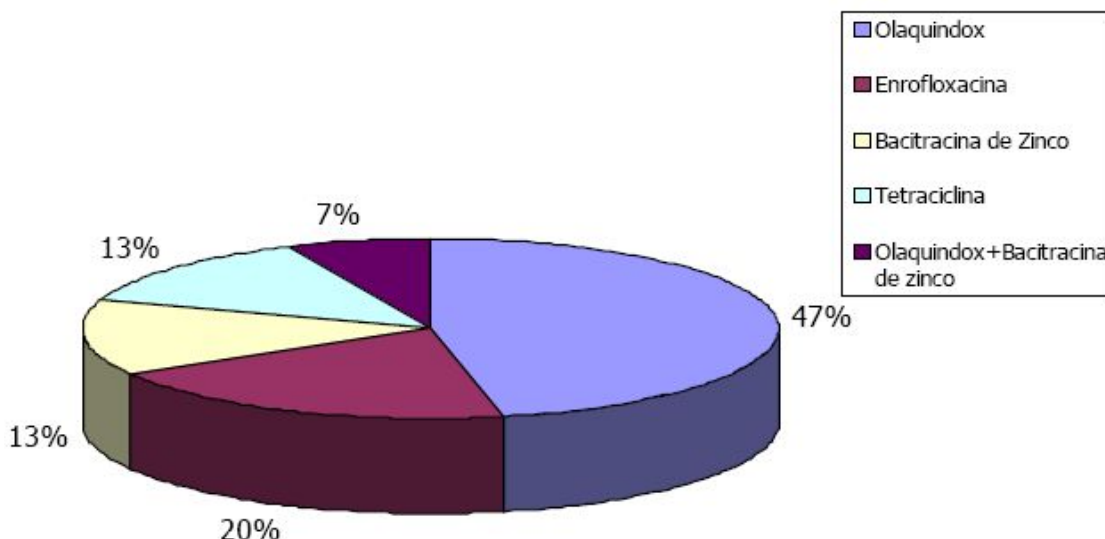


Figura 3 - Utilização de antimicrobianos em galinhas poedeiras como medicamento profilático, citados em 42 granjas no Estado do Paraná, de junho a outubro de 2004.

Fonte: Machinski Junior et al., 2005.

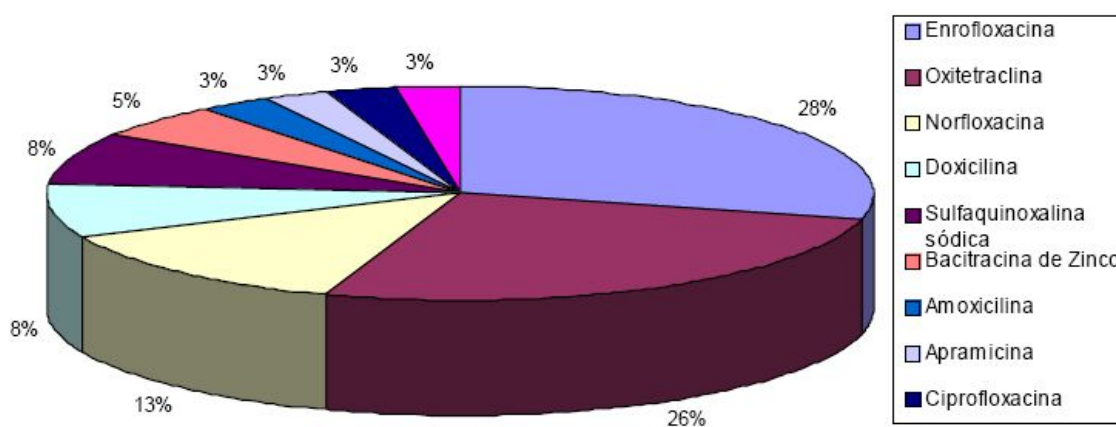


Figura 4 - Utilização de antimicrobianos em galinhas poedeiras como medicamento terapêutico, citados em 42 granjas no Estado do Paraná, de junho a outubro de 2004.

Fonte: Machinski Junior et al., 2005.

2.1.1.1 Beta-lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cefazolina, oxacilina, dicloxacilina, nafcilina, cloxacilina, penicilina G, penicilina V) são largamente utilizados no tratamento de mastite em vacas leiteiras, mas seu uso também é comum no rebanho bovino de corte, em suínos e em

aves (Bogialli, 2009). Nessa última espécie também são utilizados para tratar infecções respiratórias e artrites ou como aditivo alimentar para preveni-las. São rapidamente excretados do sangue por via renal, e eliminados em sua maior parte na urina, embora possam ser encontrados em pequena quantidade também na bile e nas fezes (Santos et al., 2001; Doyle, 2006).

Todos os beta-lactâmicos têm um elemento estrutural em comum, o anel azetidínico de quatro membros, ou anel beta-lactâmico. Na maioria dos antibióticos, o anel central é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis (di-hidrotiazínico) membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente. O mecanismo de ação dos beta-lactâmicos ocorre pela inibição irreversível da enzima transpeptidase, interferindo na última etapa da síntese do peptidoglicano (Spinosa, 2011) e impedindo, desta forma, a síntese da parede celular bacteriana (Walsh, 2003; Guimarães et al., 2010).

Segundo Bogialli (2009), a manipulação dessas cadeias pode promover o aumento do espectro de ação desses antibióticos e as modificações na molécula do ácido 6-aminopenicilânico e no espectro de ação das penicilinas permitem classificá-las em vários grupos.

As penicilinas naturais, obtidas a partir de variedades do fungo *Penicillium* são denominadas por letras maiúsculas do alfabeto (penicilina G). A penicilina G (benzilpenicilina) é inativada pelo pH ácido do estômago razão pela qual é administrada por via parenteral. O ácido gástrico hidrolisa a cadeia lateral amídica e abre o anel beta-lactâmico, fazendo com que a penicilina G perca sua atividade antibacteriana. A penicilina V, ou fenoximetilpenicilina, obtida por fermentação do *Penicillium* com a introdução do ácido fenoxiacético, tem espectro de ação antimicrobiana semelhante ao das penicilinas naturais, diferindo apenas por sua resistência ao pH ácido. Penicilinas resistentes às penicilinases são também chamadas de antiestafilocócicas, por agirem sobre o *Staphylococcus aureus* produtor de penicilinase. As isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina) são estáveis em meio ácido podendo ser, por isso, administradas por via oral (Spinosa, 2011c). Segundo a autora as penicilinas de largo espectro de ação são

semisintéticas e surgiram na busca de medicamentos cada vez mais eficientes fazendo parte desse grupo as aminopenicilinas e as amidopenicilinas. No primeiro grupo encontram-se a ampicilina e a amoxicilina e no grupo das amidopenicilinas tem-se o mecilnam.

A manipulação das substâncias deste grupo necessita de algumas precauções, pois os beta-lactâmicos são bastante solúveis em água e apresentam, na sua estrutura, anéis instáveis de quatro membros que promovem degradação da molécula por aquecimento e isomerização em meio ácido (Bogialli, 2009). Em virtude dessas particularidades a otimização dos procedimentos de extração e purificação para estes analitos deve ser realizada com as condições bem controladas para que não ocorra degradação dos mesmos. De acordo com Kinsella et al. (2009), em presença de metanol os anéis característicos deste grupo podem sofrer reação de metanólise levando a formação de éteres metílicos ou ácidos penicilônicos, motivo pelo qual este solvente não pode ser utilizado na extração.

As penicilinas comercializadas para uso na avicultura são a fenoximetilpenicilina (penicilina V) e as aminobenzilpenicilinas (ampicilina e amoxicilina). Esses produtos estão disponíveis para uso em rações ou via água de bebida sendo indicadas para o tratamento de enterite necrótica causada por *Clostridium*, espiroquetose intestinal, para tratamento da erisipelose em perus associada com estreptomicina e a ampicilina é recomendada para tratamento de colibacilose, estafilococose e salmonelose. Quando associadas com aminoglicosídeos podem apresentar efeito aditivo ou sinérgico contra algumas bactérias (Ito et al., 2005).

Algumas espécies de aves são mais susceptíveis à penicilina G procaína. Resíduos de penicilina na carcaça de aves abatidas e em ovos são considerados um risco para a saúde humana em virtude da

possibilidade de promover reações alérgicas. As penicilinas potássica e sódica podem causar desequilíbrio eletrolítico quando ministradas em doses elevadas ou em animais com cardiopatias, doença renal ou desequilíbrio eletrolítico (Ito et al., 2005).

As cefalosporinas provêm do fungo *Cephalosporium acremonium* e apresentam mecanismo de ação semelhante ao das penicilinas, por impedirem a síntese da parede celular do microrganismo. Há disponibilidade de mais de 20 cefalosporinas que podem ser classificadas em gerações, segundo características e ordem cronológica de sua síntese e, atualmente, quatro gerações estão disponíveis no comércio (Ito et al., 2005).

São absorvidas por via oral e a meia-vida é de aproximadamente uma a duas horas. Possuem ampla distribuição no organismo e, por isso, atingem elevadas concentrações no sangue, urina, bile, fluidos pleural, pericárdico e sinovial, tecido ósseo cortical e medular e líquido cefalorraquidiano. Diante do exposto, pode-se explicar a utilidade do grupo para o tratamento de septicemias causadas por bactérias como salmonelas, estafilococos e pasteuras (Spinosa, 2011c).

O núcleo básico desses antibióticos é o ácido 7-aminocefalosporânico. O isolamento desse núcleo foi fundamental para a obtenção dos derivados semissintéticos das cefalosporinas disponíveis no comércio.

2.1.1.2 Tetraciclina

As tetraciclina compreendem um grupo de antibióticos usados terapêutica e profilaticamente em animais de produção (Blanchflower et al., 1997), produzidas por diversas espécies de *Streptomyces* sendo algumas semissintéticas (Spinosa, 2011a). São antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese protéica dos microrganismos sensíveis, possuindo amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, incluindo micoplasma, bactérias intracelulares como clamídias e riquetsias e, até mesmo, alguns protozoários (Santos et al., 2001; Tortora et al., 2005; Spinosa, 2011a). Além de seu uso no tratamento de infecções, principalmente respiratórias e gastrointestinais, as tetraciclina também são utilizadas como aditivo alimentar (promotores de crescimento) para aves e suínos (Madigan et al., 2004).

A estrutura básica das tetraciclina consiste de um hidronaftaceno com quatro anéis fundidos. São anfóteras, solúveis em soluções ácidas, básicas e solventes orgânicos polares, particularmente alcoóis, mas insolúveis em hidrocarbonetos saturados. Quando submetidas a condições extremas de acidez e alcalinidade, as moléculas se degradam formando epímeros reversíveis:

4-epitetraciclina, anidrotetraciclina e isotetraciclina (Kinsella et al., 2009). Esse processo ocorre no carbono quatro pela alteração da posição do grupo dimetilamino (epimerização), o que pode ocorrer em todas as tetraciclina (fig. 5). Contudo, ao contrário das tetraciclina, os epímeros não apresentam atividade antimicrobiana (Blanchflower et al., 1997).

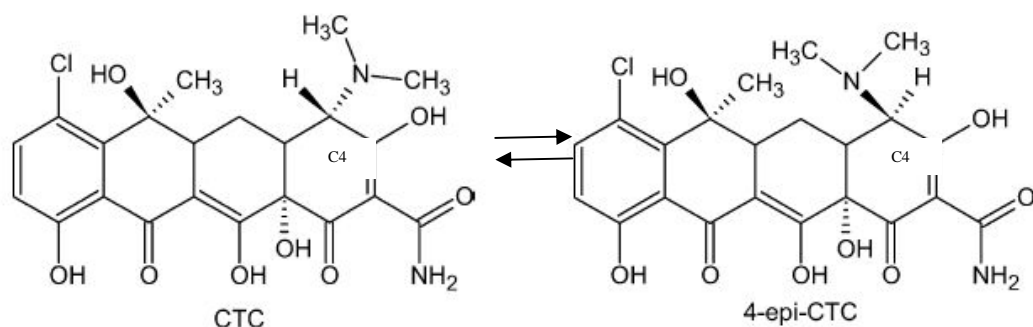


Figura 5. Reação de epimerização da clortetraciclina.

Fonte: Posyoniak et al., 2005.

As tetraciclinas podem ser administradas por via oral sendo absorvidas no trato digestivo, contudo, a presença de alimento pode prejudicar a absorção pela formação de quelatos na presença de cálcio, magnésio, zinco, ferro e alumínio (Spinosa, 2011a). O cloridrato de tetraciclina, oxitetraciclina e a doxiciclina são solúveis em água, mas a clortetraciclina apresenta-se pouco solúvel (Ito et al., 2005). Já os derivados sintéticos apresentam característica lipofílica o que, segundo Spinosa (2011a) favorece a penetração do medicamento nos tecidos.

2.1.1.3 Sulfonamidas

As sulfonamidas, sulfonamídicos ou sulfas foram os primeiros antimicrobianos eficazes utilizados por via sistêmica, na prevenção e cura das infecções bacterianas, no homem e nos animais. Quando administradas em concentrações terapêuticas, são bacteriostáticas e, em concentrações altas, são bactericidas, mas, nessas concentrações, podem causar graves reações adversas ao hospedeiro (Górniak, 2011).

Esse quimioterápico é um análogo estrutural do ácido para-aminobenzoico (PABA), uma substância essencial para síntese de ácido fólico, o qual, por sua vez, quando em sua forma reduzida (ácido tetraidrofólico) é fundamental para a síntese de DNA e RNA bacteriano, portanto, as sulfas funcionam como um antimetabólito (De La Cruz et al., 2011; Górniak, 2011).

As sulfas possuem amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas como Enterobacteriaceae, clamídias e protozoários (Ito et al., 2005). O emprego das sulfas foi, em grande parte, substituído por outros antimicrobianos, visto que muitos dos microrganismos desenvolveram resistência. Por outro lado, na ausência de resistência, as sulfas têm grande vantagem sobre vários antimicrobianos; entre as principais, de grande importância em Medicina Veterinária, citam-se o baixo custo e a administração oral (Górniak, 2011). Segundo Ito et al. (2005), são comumente encontradas para uso na avicultura a sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfamerazina, sulfatiazol e sulfadiazina.

As sulfonamidas são administradas por via oral na água ou ração e têm sido extensivamente utilizadas como agentes terapêuticos, principalmente para controle de coccidiose, pulorose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas (Hoff, 2008) e a associação com diaminopirimidina pode ser utilizada no controle de infecções por *E. coli*, *Haemophilus paragallinarum*, cólera aviária e salmoneloses (Ito et al., 2005). Em poedeiras, a administração de doses elevadas de sulfas (0,5% da ração) poderá causar diminuição da postura e produção de ovos defeituosos, com casca fina e enrugada (Górniak, 2011). De acordo com Hoff

(2008), o uso de sulfadimetoxina na água de bebida em uma concentração de 0,05% e de sulfaquinoxalina a 0,1% é capaz de provocar queda na produção de ovos, perda da qualidade da casca, produção de ovos vermelhos despigmentados e aumento de mortalidade.

A eficiência das sulfonamidas e suas associações nos diferentes quadros patológicos pode variar de acordo com a concentração plasmática atingida que é diretamente relacionada com o tipo de sulfa usada. Além disso, a espécie animal é fator importante ao se considerar a taxa de absorção, sendo as aves os animais que mais rapidamente absorvem esse quimioterápico (Górniak, 2011). Contudo, biodisponibilidade das sulfonamidas e das diaminopirimidinas, quando aplicadas por via sistêmica, é mais elevada se comparada com a obtida por via oral. Podem-se observar, também, variações na resposta de acordo com a apresentação comercial, uma vez que as sulfonamidas são pouco solúveis em água e pH alcalino e a formulação como sal de sódio aumenta a sua solubilidade (Ito et al., 2005). As sulfas se distribuem amplamente por todos os tecidos do organismo, mas, de maneira geral, a quantidade absorvida em locais como útero, glândula mamária e pele é muito pequena (Górniak, 2011).

2.1.1.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas, inibidores da síntese proteica e amplamente utilizados contra bactérias Gram-negativas, em suspeita de bacteremia ou endocardite. São compostos de um grupo amino básico e uma unidade de açúcar ou grupo glicosídeo apresentando melhor atividade em pH levemente alcalino (em torno de 7,4), onde estão positivamente carregados (Guimarães et al., 2010).

A maioria é produzida por microrganismos (*Streptomyces* spp, *Micromonospora* sp, e

Bacillus sp.) e destacam como representantes desse grupo a neomicina, gentamicina, tobramicina, amicacina e estreptomicina (Spinosa, 2011b).

São moléculas solúveis em água sendo altamente ionizáveis em pH fisiológico por serem policações básicas. Sua estrutura química está relacionada com a atividade microbiana, com a resistência bacteriana e com a capacidade de produzir efeitos tóxicos (Spinosa, 2011b).

Todos são antibióticos de ação bactericida rápida, concentração-dependente e com efeito residual após interrupção de uso (Ito et al., 2005). Por se ligarem especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedem o movimento do ribossomo ao longo do RNA mensageiro e, conseqüentemente, interrompem a síntese de proteínas ou levam à incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica que está sendo formada, dando origem a proteínas defeituosas (Guimarães et al., 2010; Górniak, 2011),

Na avicultura, os aminoglicosídeos mais utilizados são a neomicina, apramicina, gentamicina e espectinomicina associados à lincomicina, antimicrobiano pertencente ao grupo das lincosamidas, com o objetivo de tratar infecções mistas e obter maior efeito terapêutico. Usualmente a neomicina é empregada como sulfato de neomicina B, solução líquida ou em pó solúvel para uso na água ou como *premix* para ração. A apramicina é comercializada na forma de pó solúvel e pó adicionado à ração, para uso oral em aves e a gentamicina é comercializada, principalmente, para uso parenteral, mas também encontrada na forma de pó solúvel (Spinosa et al., 2005; Górniak, 2011).

2.1.1.5 Macrolídeos e Lincosamidas

Os macrolídeos e as lincosamidas são antibióticos bacteriostáticos ou bactericidas, dependendo da concentração, usados na prevenção e no tratamento de doenças respiratórias, enterite bacteriana e na promoção do crescimento em frangos quando incorporados em níveis subterapêuticos na ração (Spisso, 2010).

Macrolídeos, grupo de antibióticos que tiveram a eritromicina como único representante de uso por 40 anos, são lactonas que se ligam a um ou mais açúcares. A maioria é derivada do fungo *Streptomyces* sp. e possuem ação bactericida ou bacteriostática, dependo da concentração, da fase e do tipo de microrganismo, apresentando maior atividade em pH alcalino (Ito et al., 2005; Spinosa, 2011a).

O mecanismo de ação dos macrolídeos se dá pela interferência na síntese protéica bacteriana ao se ligarem à subunidade 50S do ribossomo, impedindo a adição de novos aminoácidos (Spinosa, 2011a).

Os macrolídeos são compostos ativos, principalmente, contra bactérias Gram-positivas, sendo utilizados no controle e tratamento de doenças específicas em aves como as micoplasmoses, clostridioses, estafilococoses, estreptococoses (Ito et al., 2005). Para uso no Brasil estão comercialmente disponíveis a tilosina, espiramicina, eritromicina e tilmicosina (Spinosa, 2011a).

As lincosamidas são um grupo de antibióticos monoglicosídeos que possuem uma cadeia lateral semelhante à de um aminoácido. Embora apresentem estrutura química diferente quando comparados à dos macrolídeos, o espectro e o mecanismo de ação são semelhantes. Têm como principais representantes a lincomicina e a clindamicina e, recentemente, a pirlimicina foi introduzida no comércio para uso em

bovinos e a mirincamicina para uso na medicina humana. A lincomicina é usada como aditivo com o objetivo de melhorar o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte. Associada com a espectinomicina (aminoglicosídeo) é comercializada para uso oral em galinhas no controle de aerossaculite e Doença Crônica Respiratória (DCR).

2.1.1.6 Quinolonas

As quinolonas e fluoroquinolonas são grupos relacionados de antimicrobianos, obtidos por síntese laboratorial e usados no tratamento das infecções bacterianas. A primeira quinolona introduzida foi o ácido nalidíxico, seguindo-se a flumequina e o ácido oxolínico (Górniak, 2011).

O extensivo uso das quinolonas em aves tem sido facilitado por uma legislação de prescrição muito flexível, pelo aparecimento dos genéricos para uso em ração e água, com custo muito mais baixo que os primeiros produtos aprovados e, sem dúvida, pela sua eficácia contra as salmonelas. Em vários países, as quinolonas são extensivamente utilizadas no tratamento de lotes de aves infectadas por *Salmonella* Enteritidis. Anteriormente, a medicação tradicional envolvia o uso, via água ou ração, de nitrofurazona, furazolidona, novobiocina e das tetraciclina. O uso de fluoroquinolonas não é aprovado para poedeiras, contudo, devido ao potencial uso abusivo e possível produção de resíduos, faz-se imprescindível o controle por eficiente método de determinação e quantificação em ovos.

2.2 Resíduos de Medicamentos Veterinários em Ovos

A produção de alimentos baseada na garantia da qualidade visa à obtenção de produtos inócuos, ou seja, alimentos que não se constituam como fonte de perigos, sejam eles biológicos, físicos e/ou químicos e que, quando presentes, possam causar danos à

saúde (ABNT, 2006). Entre os perigos químicos existentes, destacam-se os resíduos de medicamentos veterinários, que podem representar um risco, caso não sejam observadas as boas práticas veterinárias, seja em função do uso exagerado e/ou indevido, do não cumprimento dos períodos de carência, entre outros fatores. Demais perigos químicos, como os resíduos de pesticidas, a contaminação por micotoxinas, por metais pesados, entre outros, também podem representar risco à população (Spiso et al., 2009a), quando presentes em produtos de origem animal.

Segundo o *Codex Alimentarius* o resíduo de uma droga veterinária é a fração da droga, de seus metabólitos, produtos de conversão ou reação, e impurezas que permanecem em qualquer parte comestível do alimento originário de animais tratados (Brasil, 1999).

O uso de medicamentos veterinários nos programas sanitários da avicultura de postura pode ocasionar no aparecimento de resíduos em ovos, gerando preocupação dos órgãos de saúde. Os principais fatores que determinam a ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em ovos são: o não cumprimento do tempo de carência (período entre a administração do medicamento e a coleta do ovo); a via de administração utilizada; contaminação de rações ou água com medicamentos; as propriedades físico-químicas e a biotransformação do medicamento, e as condições físicas da ave poedeira.

Os antimicrobianos possuem grande variação em relação à sua toxicidade (Brasil, 1999), e os resíduos desses medicamentos podem promover efeitos tóxicos diretos nos consumidores tais como reações alérgicas por hipersensibilidade individual frequentemente associadas aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas) e sulfonamidas que podem, até mesmo, desencadear choque anafilático em indivíduos particularmente sensíveis, ação carcinogênica associada com

o cloranfenicol, a sulfametazina e os nitrofuranos; ou indiretamente por induzir o aparecimento de resistência bacteriana (Poucke et al., 2003).

Baixos níveis de antimicrobianos administrados aos animais podem selecionar *in vivo* bactérias multirresistentes que podem ser transferidas de animais para seres humanos, especialmente nos indivíduos que trabalham diretamente com animais ou em indústrias de processamento tecnológico de produtos de origem animal ou pode acarretar a transferência de resistência múltipla entre os microrganismos através de plasmídios ou de elementos genéticos móveis (Santana et al., 2011).

A não observância dos períodos de carência dos medicamentos registrados para aves poedeiras pode originar resíduos em níveis superiores aos considerados seguros (Spinosa et al., 2005). Portanto, antes de qualquer medicamento veterinário ser comercializado para uso em animais produtores de alimentos, três considerações que dizem respeito à sua avaliação de segurança devem ser abordadas: 1) identificar e quantificar os resíduos nos tecidos comestíveis, 2) determinar por meio de testes de toxicidade as condições para o uso seguro da droga em relação à persistência dos resíduos, 3) assegurar que os resíduos não excedam o valor considerado como seguro (Alm El Dein & Elhearon, 2010).

2.3 Legislação e Limites Máximos de Resíduos (LMR's)

A questão dos resíduos de medicamentos veterinários levou ao desenvolvimento de legislações e regulamentações no âmbito nacional e internacional com o objetivo de harmonizar os valores para as diversas combinações de fármacos e matrizes. O estudo dos potenciais efeitos da ingestão de alimentos contendo níveis superiores aos limites máximos estabelecidos para um

resíduo é uma área de grande relevância no que diz respeito à saúde pública bem como nas relações internacionais do comércio (Hoff, 2008).

Existem muitas organizações envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle da utilização de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos. Esses mecanismos incluem controle da distribuição de uso, determinação do nível seguro de resíduos e da metodologia empregada para detecção e quantificação. Além disso, as legislações podem diferir consideravelmente entre diferentes países, especialmente em regiões em desenvolvimento, quando, em muitos casos, órgãos reguladores ainda estão sendo criados e desenvolvidos. Entretanto, LMR's não são estabelecidos para todos os antibióticos encontrados em produtos de origem animal (Spinosa & Tárraga, 2011).

Com a finalidade de proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos foi criada, em 1963, o *Codex Alimentarius*, Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da normalização sobre alimentos. O *Codex* é responsável pela análise crítica da literatura existente sobre a toxicidade de cada antimicrobiano usado como medicamento veterinário fixando as IDA's (Ingestões Diárias Aceitáveis) e os respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (Paschoal et al., 2008; Cunha, 2009; Palermo-Neto & Almeida, 2011; *Codex Alimentarius*, 2011).

O Brasil tornou-se membro deste Programa na década de 70 e, em 1980, criou-se o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), por meio das Resoluções 01/80 e 07/88 do CONMETRO (Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). As principais finalidades do

CCAB são a participação nos comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas *Codex* como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos.

Outros órgãos internacionais incluem a European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA), o Office International des Epizooties (OIE) e o Consultation Mondiale de Industrie de La Santé Animale (COMISA). Além desses, alguns países têm grupos de especialistas envolvidos, como o Food and Drugs Administration (FDA), nos Estados Unidos, o Bureau of Veterinary Drugs, no Canadá, e o Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, na Inglaterra.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2003, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, o PAMvet. O objetivo principal do PAMvet é avaliar os produtos expostos ao consumidor quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários por meio do consumo de alimentos, subsidiando, assim, as ações de gerenciamento e comunicação do risco associado a esta exposição.

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) abriga em sua estrutura a Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC). A CCRC é responsável por coordenar as ações de garantia de qualidade e de segurança química dos produtos de origem animal, por meio de procedimentos de amostragem e análise laboratorial. As diretrizes, programas, planos de trabalho e ações correspondentes constam do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituído pela Portaria

Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 (Brasil, 1986) e alterado pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999 (Brasil, 1999).

O PNCRC é um programa de inspeção e fiscalização oficial, baseado em análise de risco, que objetiva verificar e avaliar as boas práticas agropecuárias, as boas práticas de fabricação e os autocontroles implementados ao longo das etapas da cadeia produtiva, assim como verificar os fatores de qualidade e de segurança higiênico-sanitárias dos produtos de origem animal, seus subprodutos e derivados. A análise de riscos se baseia no gerenciamento e no controle dos perigos químicos, físicos e microbiológicos que potencialmente possam causar danos à saúde do consumidor (Brasil, 2011a). Esse plano contempla o monitoramento de resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes ambientais em diversos setores produtivos, tais como: bovino, aves, suíno, equino, avestruz, leite, mel e pescado (Brasil, 1999). Já a inspeção de ovos e derivados no Brasil se dá com base na Portaria N.º 01, de 21 de fevereiro de 1990 (Brasil, 1990).

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 42 (Brasil, 1999), a competência para estabelecer os LMR's em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. No caso de não estarem estabelecidos, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Europeia, ou ainda, os usados pelo FDA. Os limites para resíduos foram estabelecidos na forma de tolerância ou limite máximo de resíduos (LMR's), que é definido como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de medicamentos veterinários contida no alimento, expressa em $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Cunha, 2009).

Limites nacionais para medicamentos veterinários ainda não foram definidos pelo setor de saúde e, portanto, vem-se utilizando no PNCRC os níveis obtidos em referências internacionais (*Codex Alimentarius*, MERCOSUL, União Europeia e FDA/USA).

Na União Europeia, o Regulamento (CEE) N.º 2377/90 do Conselho, de 26 de junho de 1990 (European Commission, 1990), estabeleceu os limites máximos considerando que a administração de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos pode resultar na presença de resíduos possíveis de serem detectados em níveis cada vez mais baixos. Segundo o Regulamento, com o objetivo de proteger a saúde pública os LMR's devem ser estabelecidos em conformidade com princípios reconhecidos de controle de segurança, tendo em vista quaisquer outros controles científicos de segurança das substâncias que possam ter sido efetuados por organizações internacionais, em especial no *Codex Alimentarius*. Na prática, por razões econômicas, medicamentos veterinários são desenvolvidos para as principais espécies produtoras de alimentos. Com isso, poucas substâncias possuem LMR's estabelecidos para ovos, pois há um número limitado de produtos permitidos para uso em poedeiras comerciais. Essa situação propicia o uso de produtos não indicados ou ilegais (Pikkemaat et al., 2007).

Com o objetivo de aumentar a disponibilidade de medicamentos veterinários disponíveis para uso em tratamentos específicos de determinadas espécies, reduzindo a utilização indevida ou ilegal de substâncias, e diante da necessidade de simplificar a legislação vigente no que se refere aos LMR's reunindo em um único regulamento da Comissão todas as decisões que classificam as substâncias farmacologicamente ativas, revogou-se o Regulamento (CEE) N.º 2377/90 por meio do Regulamento (CE) N.º

470/2009. Diante do exposto, em 22 de dezembro de 2009 a Comissão Europeia instituiu o Regulamento (CEE) nº 37/2010 (Comunidade Económica Europeia, 2010), que estabelece os limites máximos de resíduos (LMR's) em produtos de origem

animal relativos às substâncias farmacologicamente ativas com as respectivas classificações, respeitando aos limites máximos de resíduos em ovos, e informa sobre as substâncias que não devem ser utilizadas em galinhas poedeiras (tab. 2).

Tabela 2 - Compilação dos limites de referência estabelecidos em ovos segundo o Regulamento (CEE) Nº 37/2010 da União Europeia e demais informações pertinentes ao uso de antimicrobianos para poedeiras comerciais

Grupos	Analitos	Limite de Referência $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Beta-lactâmicos	Amoxicilina Ampicilina Oxacilina Cloxacilina Dicloxacilina	Não deve utilizar em animais que produzem ovos para consumo humano para consumo humano.
	Penicilina G Penicilina V	Não Estabelecido
Tetraciclina	Tetraciclina Oxitetraciclina Clortetraciclina	200
	Doxiciclina	Não deve utilizar em animais que produzem ovos para consumo humano.
Sulfonamidas	Sulfafenazol Sulfaguanidina Sulfadiazina Sulfatiazol Sulfametazina Sulfametoxipiridazina Sulfamonometoxina Sulfadoxina Sulfaquinoxalina Sulfametoxazol	Não deve utilizar em animais que produzem ovos para consumo humano.
	Aminoglicosídeos	Espectinomicina Kanamicina Apramicina Gentamicina Dihidroestreptomicina Estreptomicina
Macrolídeos	Neomicina	500
	Espiramicina Tilmicosina Eritromicina Tilosina	Não deve utilizar em animais que produzem ovos para consumo humano. 150 200
Quinolonas	Enrofloxacina Flumequina	Não deve utilizar em animais que produzem ovos para consumo humano.
	Norfloxacina Acido Oxolínico Ciprofloxacina Ácido nalidíxico	Não Estabelecido
Lincosamidas	Clindamicina	Não Estabelecido
	Lincomicina	50
Cefalosporinas	Cefazolina Ceftiofur Nafcilina	Não Estabelecido

Cont. tabela 2

Outros	Colistina	300
	Tiamulina	1000
	Bacitracina Fosfomicina	Não Estabelecido
	Trimetropim	Não deve utilizar em animais que produzem ovos para consumo humano.

A Comissão do *Codex Alimentarius* atualizou, em 2011, os limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários. Para ovos, os limites permaneceram os mesmos de 2009 definidos pela Comissão do *Codex Alimentarius* para clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, colistina, eritromicina, espectinomicina, neomicina e tilosina (*Codex Alimentarius Commission*, 2009; *Codex Alimentarius Commission*, 2011). Os antimicrobianos e seus respectivos limites máximos de resíduos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* estão apresentados na tab. 3.

Tabela 3 – Antimicrobianos e seus respectivos Limites de Referência estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*

Grupo	Analitos	Limites de Referência ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Antimicrobianos	Clortetraciclina	400
	Oxitetraciclina	400
	Tetraciclina	400
	Colistina	300
	Eritromicina	50
	Espectinomicina	2000
	Neomicina	500
	Tilosina	300

Fonte: *Codex Alimentarius Commission*, 2009; *Codex Alimentarius Commission*, 2011.

O PNCRC para o ano de 2011 foi publicado na Instrução Normativa SDA N.º 24/2011 (Brasil, 2011a) que aprovou o escopo analítico, os limites de tolerância e a amostragem a ser aplicada, contemplando os seguintes medicamentos com seus respectivos LMR's em ovos (tab. 4).

Tabela 4 – Antimicrobianos e seus respectivos Limites de Referência estabelecidos pelo Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para a matriz ovo no ano de 2011

Grupo	Analitos	Limites de Referência ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Antimicrobianos	Nitrofurazona Furazolidona Furaladona Nitrofurantoina	1
	Cloranfenicol	0,30
	Sulfatiazol Sulfametazina Sulfadiazina Sulfaquinoxalina Sulfametoxazol Sulfadimetoxina	10

Fonte: BRASIL, 2011a. (IN 24)

CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO MULTIRRESÍDUOS

RESUMO

Para avaliar a presença de resíduos de antibióticos em ovos foi otimizado e validado um método de ensaio qualitativo e confirmatório de determinação de multirresíduos em ovos usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM). A metodologia validada foi baseada em dois diferentes procedimentos de extração, as extrações por ácido tricloroacético 5% (TCA) e por acetonitrila (ACN). Estes procedimentos foram seguidos de duas aquisições pelo LC-EM/EM com fonte de ionização *electrospray* no modo positivo que permitiu a triagem de 47 antimicrobianos pertencentes a oito classes diferentes (penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, tetraciclina, e quinolonas). O método proposto permite avaliar a presença ou ausência do analito na amostra em relação ao nível alvo de concentração estipulado para a validação e confirmá-lo antes do encaminhamento da amostra para a análise por um método de quantificação. Para a avaliação do desempenho foi utilizado um protocolo de validação capaz de provar a sensibilidade do método em detectar todos os antimicrobianos no nível de interesse proposto (Limite Máximo de Resíduos e 0,75 do Limite Máximo de Resíduos). Os resultados da validação demonstraram claramente a aplicabilidade do método para a detecção e confirmação de 44 analitos, com exceção da amoxicilina, ampicilina e flumequina.

Palavras-Chave: ovos, antimicrobianos, multirresíduos, validação, CL-EM/EM.

ABSTRACT

In order to assess the existence of antibiotic residues in eggs, an optimized and validated method of qualitative assay and confirmatory multiresidue determination in eggs was used applying liquid chromatography coupled to mass spectrometry sequence (LC-MS/MS). The methodology was validated based on two different extraction procedures, extractions by 5% trichloroacetic acid (TCA) and acetonitrile (ACN). These procedures were followed by two acquisitions from LC-MS/MS source with *electrospray* ionization in positive mode allowing the screening of 47 antimicrobials belonging to eight different classes (penicillins, cephalosporins, sulfonamides, macrolides, lincosamides, aminoglycosides, tetracyclines, and quinolones). The proposed method allows the assessment of existence or absence of analyte in the sample relative to the target level of concentration required for validation and its confirmation prior to forwarding the sample for analysis by a method of quantification. For the evaluation of the performance, we used a validation protocol able to prove the sensitivity of the method in identifying all antimicrobials in the proposed level of interest (Maximum Residue Limit and 0.75 of the Maximum Residue Limit). The validation results clearly demonstrated the applicability of the method for the identification and confirmation of 44 analytes, with the exception of amoxicillin, ampicillin and flumequine.

Keywords: eggs, antimicrobials, multiresidue, validation, LC-MS/MS

1. Introdução

A pesquisa e o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em ovos possibilitam o conhecimento da exposição das poedeiras a substâncias nocivas à saúde, impedindo a comercialização de ovos e derivados que se originem de granjas onde se constata o uso indevido ou inadequado dos medicamentos.

Desde 2008, a avicultura de postura nacional se mobiliza para complementar o PNCRC com a pesquisa de resíduos e contaminantes, objetivando melhorar a qualidade do produto garantindo, assim, a segurança do consumidor. Consequentemente, a complementação do PNCRC proporcionaria ao país e aos produtores de ovos condições para se adequar às exigências internacionais do comércio de Produtos de Origem Animal.

O uso de métodos de controle de qualidade já é rotina para as empresas avícolas brasileiras. Sob as novas circunstâncias, nas quais as barreiras não tarifárias, principalmente as barreiras sanitárias, são utilizadas com frequência cada vez maior, a preocupação com a sanidade dos plantéis é uma constante. Contudo, a quantidade de substâncias abrangidas pelo PNCRC não é suficiente para os padrões internacionais, o que prejudica diretamente as exportações brasileiras de ovos, em especial para os países da União Europeia entre outros destinos. A inclusão de novas substâncias traria maior credibilidade ao setor e agilizaria a abertura de novos mercados para o produto nacional.

A Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes publica o PNCRC anualmente, com informações sobre a execução do programa, as substâncias que serão monitoradas, os limites de tolerância e o número de amostras a serem coletadas. Há uma demanda da CCRC em ampliar o escopo analítico para ovos visando garantir a inocuidade dos produtos ofertados para a

população brasileira, possibilitando ao setor produtivo nacional a equivalência necessária para a exportação de ovos. É fato que uma das principais barreiras para o aumento das exportações é a falta de conclusão do PNCRC para o setor de ovos, sendo necessário um esforço para a introdução de novos métodos de análise que sejam capazes de abranger boa parte dos medicamentos disponíveis para uso na produção.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Análises de Resíduos de Antimicrobianos

Os atributos relacionados à segurança do alimento não são facilmente verificáveis visualmente, podendo considerá-los como percebidos em sua maioria intrinsecamente. Os principais exemplos são os alimentos com: i) determinado padrão de qualidade intrínseca (sabor e textura), ii) seguros (ausência de microrganismos), iii) não modificados geneticamente (propiciado pela engenharia genética), iv) não irradiados, v) funcionais ou nutracêuticos (por avanços na área de nutrição), vi) produzidos com práticas que não agridem o bem estar dos animais, que sejam “naturais” e ambientais quanto possíveis (agricultura orgânica), ou, ainda, que possam determinar a origem do produto (Donato et al., 2009).

A análise de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal desempenha papel importante para a sociedade por estimar a exposição do homem e do meio ambiente a essas substâncias. Além disso, é possível avaliar e controlar os riscos, associados com a matéria-prima, as práticas agrícolas e as atividades de processamento dos alimentos, para a saúde do consumidor. A política alimentar, baseada nas diretrizes internacionais do *Codex Alimentarius* no que se refere ao princípio de análise de riscos e aos três componentes que esta engloba (avaliação científica, gestão e comunicação),

possibilita a aplicação de medidas regulamentares eficazes para gerir esses riscos impondo sistemas de controle destinados a supervisionar e a assegurar o cumprimento da legislação (*Codex Alimentarius*, 2011).

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Para que esses métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizadas e cumpram requisitos que garantam bons resultados. Com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, são delineados procedimentos de validação do processo analítico empregado, como garantia da qualidade das medições químicas, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (Paschoal, 2008). Limites máximos de resíduos específicos para cada analito alvo são estabelecidos, os quais devem ser levados em consideração no estabelecimento de um protocolo para validação do método analítico a ser empregado na determinação desses resíduos nos alimentos.

As orientações técnicas e os critérios de desempenho dos métodos para controle de resíduos foram descritos na Diretiva 657/2002 (European Commission, 2002). Na União Europeia, não existe a obrigação de utilizar métodos normalizados para controle dos resíduos, em vez disso, estabeleceram-se critérios de desempenho (European Commission, 2002), que devem ser cumpridos pelos métodos utilizados. Logo, gera-se flexibilidade na utilização dos métodos o que é uma grande vantagem, pela pronta adaptação dos métodos analíticos à evolução técnica. Além disso, é possível resolver situações diversas como a que se refere à análise de analitos em matrizes que não tenham ainda métodos estabelecidos. É importante ressaltar que a Diretiva 657/2002

(European Commission, 2002) leva em consideração as recentes evoluções técnicas, como a utilização da cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM) para a análise de resíduos, o que justifica a posição dos países pertencentes à União Europeia que, para determinação dos antimicrobianos em amostras biológicas, exigem a utilização de métodos que apliquem a espectrometria de massas.

Muitos artigos têm reportado a aplicação de diferentes ferramentas analíticas na detecção de resíduos de antimicrobianos. Em muitos destes artigos faz-se uso de métodos microbiológicos, enzimáticos/colorimétricos, imunoenaios (imunoenzimáticos e radioimunoenaios), e metodologias físico-químicas a partir de técnicas cromatográficas, como cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida com detector Ultravioleta, de fluorescência e cromatografia iônica que se refere aos métodos de cromatografia de pares iônicos, exclusão iônica e troca iônica, incluídos na cromatografia líquida de alta eficiência (Mitchel et al., 1998; Schneider & Donoghue, 2003; Pikkemaat et al., 2007).

Métodos analíticos para o monitoramento de resíduos podem ser classificados em dois grandes grupos: métodos *screening* ou de triagem e métodos confirmatórios. Os métodos de triagem podem detectar a presença de um analito ou de um grupo de analitos num determinado nível de interesse. As características ideais para os métodos de triagem incluiriam as baixas taxas de resultados falsos positivos, o rendimento do método, a simples e fácil utilização, a rapidez de execução, a seletividade e o baixo custo. Contudo, é difícil para um método apresentar todos esses requerimentos.

Métodos microbiológicos são baratos e apresentam alto rendimento, mas a seletividade não é adequada, não são

confirmatórios e o tempo necessário para a obtenção dos resultados pode ser longo. O método de ELISA permite processamento simultâneo de um grande número de amostras em um curto período de tempo, mas é difícil de ser implementado para a triagem de multirresíduos, pois apresenta grande variação na sensibilidade para diferentes compostos, fornecendo uma resposta genérica para compostos de uma mesma classe.

2.1.1 Análises Físico-Químicas de Resíduos de Antimicrobianos

A análise físico-química de resíduos de medicamentos veterinários consiste num processo químico em que há extração dos resíduos de uma amostra, purificação do extrato e posterior detecção dos analitos (Kinsella et al., 2009). Diversos métodos instrumentais podem ser utilizados tais como as técnicas de cromatografia líquida (LC) com detecção por ultravioleta (UV), fluorescência ou detecção eletroquímica. Contudo, a técnica que tem garantido maior aceitação para o propósito de triagem é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EM), em função da alta seletividade e, principalmente, alta sensibilidade e por permitir a análise de grande número de analitos em uma única corrida, além de poder ser um método confirmatório. A principal ferramenta do método de triagem deve estar relacionada com o tratamento da amostra. Esse tratamento deve ser o mais simples possível sem, contudo, comprometer o funcionamento e a resposta do espectrômetro de massas (Blanchflower et al., 1997; Hammel et al., 2008; Companyó et al., 2009; Moreira, 2012). Recentemente, foram desenvolvidos métodos que têm a capacidade de analisar multirresíduos e multiclases de substâncias, como por exemplo, o método publicado por Hammel et al. (2008), que identifica 42 antibióticos, pertencentes a seis classes diferentes, em mel.

Cromatografia é um método físico-químico de separação que está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária (Cass e Degani, 2001).

Espectrometria de massas é uma técnica instrumental baseada na fragmentação de moléculas no estado gasoso por bombardeamento de feixe de elétrons. Esta fragmentação produz moléculas carregadas e o resultado é expresso na forma de espectros de massas. Basicamente, este equipamento é composto por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e um detector de íons. Primeiramente, os analitos são ionizados em fase gasosa na fonte, que pode ser do tipo: *electrospray* (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI), ionização de matriz assistida por laser (MALDI), entre outras. Em seguida, os íons formados são direcionados ao analisador de massas, que os separa conforme sua relação massa-carga (m/z) e/ou promove fragmentação dos mesmos. O fim do processo ocorre com a detecção dos íons e posterior formação do espectro de massas (Silverstein et al., 1994; Guerrero e Kleiner, 2005).

Os equipamentos usados na espectrometria de massas apresentam, de modo geral, uma composição básica comum variando nas diferentes formas de ionização. Diversas fontes são aplicadas na formação dos cátions/ânions, dependendo das características das substâncias a se trabalhar. No caso dos antibióticos a ionização mais utilizada é o *electrospray* (ESI), tanto no modo positivo quanto no modo negativo (Riediker et al., 2004; Fagerkist et al., 2005; Stolker et al., 2007; Hammel et al., 2008; Holthoon et al., 2010; Moreira, 2012). O modo de ionização ESI baseia-se na aplicação de um campo elétrico forte sobre uma névoa da solução à pressão atmosférica. Este campo induz a formação de compostos

carregados na entrada do espectrômetro de massas sem que haja fragmentação dos mesmos, pois a energia interna adquirida pelas substâncias neste processo é baixa. Esta técnica ioniza moléculas diretamente da solução, por isso, pode ser facilmente conectado com os métodos de separação cuja fase móvel é um líquido (Guerrera e Kleiner, 2005).

O analisador de massas quadrupolar separa os íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z). O sistema consiste de quatro cilindros paralelos nos quais é

aplicado uma corrente elétrica que permite criar um campo elétrico capaz de estabilizar a trajetória dos íons selecionados. A grande popularidade dos espectrômetros de massas sequenciais pode ser atribuída ao surgimento de um instrumento do tipo triplo-quadrupolo em 1978. Os quadrupolos, quando usados sequencialmente, possibilitam a realização de estudos de fragmentação dos íons com análises sequenciais (EM^n). Espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo possuem três quadrupolos dispostos sequencialmente como apresentando na fig. 6.

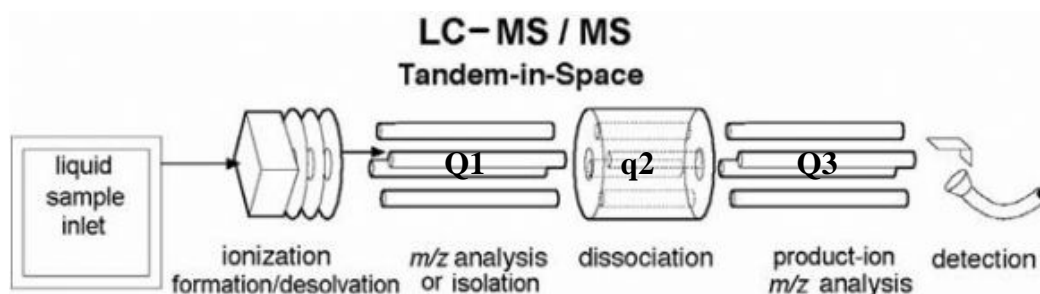


Figura 6 - Esquema de um equipamento do tipo triplo quadrupolo.

Nesse modo, os analisadores de massas Q1 (primeiro quadrupolo) e Q3 (terceiro quadrupolo) selecionam os íons precursores e produtos, respectivamente, definindo uma transição de massa/carga específica. O segundo quadrupolo (q2) funciona como uma câmara de colisão, onde os íons precursores, selecionados de acordo com suas razões m/z em Q1, são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisões com um gás inerte numa energia específica.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) é uma poderosa técnica analítica para análises de alimentos devido a sua alta seletividade e sensibilidade que combina separação física realizada pela cromatografia líquida com a análise de massas, habilidade da espectrometria. Dessa forma, o campo de análises de antibióticos

em alimentos se tornou promissor por ser possível quantificar o antibiótico em níveis baixos (Almeida, 2011).

A técnica vem se destacando, também, devido a sua alta especificidade, principalmente quando o espectrômetro de massas é utilizado no modo “Multiple Reaction Monitoring” (MRM) ou Monitoração de Reações Múltiplas. Otimizando o detector para tal experimento (MRM) e estabelecendo-se mais de uma transição para os íons precursores, gera-se um método confirmatório. Desta forma, o emprego da técnica CLAE-EM/EM fornece informações referentes ao tempo de retenção do composto (parâmetro cromatográfico), às transições monitoradas (de quantificação e de confirmação) e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade de acordo com os LMR’s

estabelecidos. Esse método, portanto, permite a análise multirresíduo simultânea de várias classes de drogas e não somente a análise de um único grupo (Moreira, 2012).

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é o avanço mais atual das técnicas cromatográficas, surgindo a partir da evolução da cromatografia líquida de alta eficiência. O que motivou esse desenvolvimento foi à necessidade de análises mais rápidas, mantendo o desempenho cromatográfico das técnicas atuais (Maldamer e Jardim, 2009).

O desenvolvimento da CLUE está diretamente relacionado com o surgimento de fases estacionárias esféricas, porosas e com diâmetros reduzidos, que se deram a partir de 1996. As colunas produzidas com essas fases apresentam grandes vantagens em relação às colunas de partículas maiores, por exemplo, o aumento significativo de pratos teóricos. Entretanto, colunas que possuem partículas de tamanho reduzido necessitam de tecnologia de instrumentação mais avançada para a utilização, que os equipamentos de cromatografia líquida convencional não apresentavam. Baseado neste fato, esses equipamentos tiveram que ser adaptados às novas condições de trabalho desse tipo de coluna. Dentre as principais modificações, estão: capacidade de trabalhar em altas pressões, volumes internos reduzidos, detectores com alta taxa de aquisição, colunas resistentes a pressões elevadas e injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (Maldamer e Jardim, 2009).

As colunas do sistema CLUE conferem à técnica aumento considerável da resolução, aumento da detectibilidade e redução significativa no tempo de análise, quando comparada às demais cromatografias. Vale destacar, que o interessante da redução do tempo de análise é que proporciona uma considerável economia de solvente, o que é altamente positivo em se tratando de meio

ambiente, por isso a CLUE é considerada como cromatografia “verde” (Maldamer e Jardim, 2009).

Diversos produtos de origem animal podem ser utilizados como matriz para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos tais com o rim, o fígado, o músculo, a gordura e a pele. Além dos tecidos animais, outras matrizes são comumente analisadas como o leite, o mel e o ovo. Algumas mais incomuns podem ser pesquisadas como, por exemplo, o monitoramento de beta-agonistas feito na retina dos animais e de esteróides anabolizantes em pelos ou urina (Kinsella, et al., 2009).

No caso dos tecidos animais, o músculo é a matriz apropriada para pesquisa de resíduos de drogas veterinárias, quando o objetivo é a saúde do consumidor, pois corresponde ao tecido que é mais consumido. Entretanto, esta matriz apresenta grandes variações na distribuição dos resíduos, além de ser o tecido com menor probabilidade de acúmulo de resíduos quando comparado ao fígado e rim (Kinsella, et al., 2009), tecidos mais apropriados para o monitoramento do uso correto do medicamento. Os analitos se apresentam nas matrizes de forma bastante variada. Muitas vezes não se encontram na forma da droga originalmente administrada, mas na forma de derivados ou metabólitos. A maioria das drogas veterinárias é extraída das matrizes por solventes orgânicos, água ou soluções tampão. No entanto, algumas vezes, elas se encontram em forma conjugada, com ligações ou interações fracas com a matriz e necessitam de condições mais específicas para sua extração como, por exemplo, hidrólises químicas ou enzimáticas. Em reações de hidrólise química, geralmente são verificadas variações de pH, temperatura e tempo de extração, que devem ser otimizadas por serem capazes de provocar degradação do analito a ser pesquisado. Com relação à hidrólise enzimática, geralmente se estudam pequenas variações da reação em meio

alcalino ou levemente ácido. Em ambos os casos, a otimização dos métodos objetiva maior eficiência na extração dos resíduos da matriz em estudo. Poucos analitos apresentam interações com a matriz o que promove dificuldade na extração dos mesmos. Entre eles, destacam-se os nitrofuranos, florfenicol e triclabendazol (Kinsella et al., 2009).

2.2 Validação de Métodos Analíticos

Uma das tendências em química analítica moderna é o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e métodos capazes de identificar e quantificar os componentes em amostras complexas, tais como as relacionadas com os alimentos. O uso de técnicas associadas, como a combinação de cromatografia com espectrometria de massas é exemplo dessa evolução (Trullols et al., 2004).

Há um demanda crescente e significativa por informações rápidas e confiáveis e, embora a maioria das informações se refira a aspectos quantitativos, mais e mais sistemas analíticos que resultem em respostas binárias do tipo sim/não estão sendo desenvolvidos. Tais sistemas indicam se o analito se encontra acima ou abaixo de um limite específico (Pulido et al., 2002).

Em laboratórios de rotina é comum, na primeira etapa do processo de análise, a determinação da presença ou não de um ou mais analitos na amostra e, se assim for, prosseguir para a segunda etapa na qual se realiza a estimativa do nível de concentração do analito. Métodos qualitativos são usados, nesses casos, como técnicas de triagem que permitem economia de tempo e redução no custo de análise (Trullols et al., 2004).

A qualidade dos resultados fornecidos por esses métodos qualitativos é de extrema importância e, para garantir que um novo método analítico gere informações

confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (Trullols et al., 2004; Moreira, 2012).

Muitas diretrizes de validação estão disponíveis e são aceitas por órgãos reguladores, e as orientações gerais sobre o procedimento de validação para métodos de análise qualitativos podem ser encontradas na Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002). Os principais órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos no Brasil são o MAPA (Brasil, 2009), a ANVISA (2003) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO, 2011).

A validação é um recurso importante em qualquer método de medida, pois está intimamente relacionada com a qualidade dos resultados. Um método de análise caracteriza-se por seus parâmetros de desempenho, que têm de ser avaliados. Esses valores de desempenho devem ser requisitos que o método de análise deve satisfazer, mas, acima de tudo, os parâmetros de desempenho dependem do tipo de método e de suas características intrínsecas. Considerando a aplicabilidade dos métodos qualitativos de análise e a importância dos campos em que eles são usados, a validação do método é fundamental para a qualidade dos resultados finais (Moreira, 2012).

Segundo o Guia para validação de métodos de triagem de medicamentos veterinários (European Commission, 2010), a escolha da concentração alvo do analito para a validação deve levar em consideração que, após a triagem, a amostra será classificada como conforme ou não conforme. Para os analitos autorizados, a concentração alvo poderá ser o LMR ou um valor abaixo. Para os analitos proibidos ou não autorizados a concentração alvo deve ser igual ou inferior ao LMPR (limite mínimo de performance requerida), ou seja, a menor concentração do

analito que se espera detectar no método de triagem.

3. Material e Métodos

Todas as etapas do procedimento de validação foram baseadas no método de referência LMV/RMV/SM/PTC/04. AN, versão 3, de 08 de abril de 2010, validado no *Community Reference Laboratory for Antimicrobial Residues, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFFSA), Laboratoire d'Etude et de Recherche sur les Médicaments Vétérinaires et les Désinfectants*, localizado na França e que foi fornecido ao LANAGRO/MG por meio de convênio de cooperação técnica sob forma de treinamento (Gaugain-Juhel et al., 2010). O método original foi validado para as matrizes músculo e leite e, por isso, otimizações foram necessárias para a aplicação do método na matriz ovo.

Todos as análises descritas foram realizadas no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM/PL) do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG), localizado em Pedro Leopoldo/Minas Gerais.

3.1 Padrões, Soluções e Reagentes

Preparo de soluções

As soluções padrões de antibióticos foram preparadas a partir de padrões de referência que apresentavam certificado declarando pureza, validade entre outros (tab. 5). As concentrações das soluções estoque obedeceram às concentrações trabalhadas em cada método de rotina desenvolvido no laboratório, com as devidas correções pelo grau de pureza. Posteriormente, as soluções estoque foram diluídas resultando nos níveis de concentração de trabalho (soluções de adição).

Tabela 5 - Informações referentes aos padrões de antimicrobianos para o preparo das soluções padrões utilizadas na validação do método multirresíduos

Padrão	Pureza (%)	Marca e Origem	Padrão	Pureza (%)	Marca e Origem
Amoxicilina	99,3	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Espectinomicina	99,8	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Ampicilina	98,6	Sigma-Aldrich (EUA)	Dihidroestrepomicina	98	Sigma-Aldrich (EUA)
Oxacilina	90,8	Sigma-Aldrich (Suíça)	Estreptomicina	76,7	Sigma-Aldrich (EUA)
Cloxacilina	88,4	Sigma-Aldrich (EUA)	Kanamicina	90	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Dicloxacilina	99,8	Sigma-Aldrich (EUA)	Apramicina	≥97,7	Sigma-Aldrich (Suíça)
Penicilina G	≥98	Sigma-Aldrich (Suíça)	Gentamicina	69,1	Sigma-Aldrich (EUA)
Penicilina V	98,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Neomicina	86,3	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Cefazolina	96,8	Sigma-Aldrich (EUA)	Tobramicina	100	Sigma-Aldrich (EUA)
Nafcilina	85,6	Sigma-Aldrich (EUA)	Higromicina	66	Sigma-Aldrich (EUA)
Sulfafenazol	>99	Sigma-Aldrich (EUA)	Amicacina	74,8	Sigma-Aldrich (Suíça)
Sulfaclopiridazina	99,7	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Lincomicina	≥95	Sigma-Aldrich (Suíça)
Sulfadiazina	99,0 ± 0,5	Dr.Ehrenstorfer (Alemanha)	Tetraciclina	97,7	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Sulfatiazol	99,5 ± 0,5	Dr.Ehrenstorfer (Alemanha)	Oxitetraciclina	98,1	Sigma-Aldrich (Alemanha)

Cont. tabela 5

Sulfametazina	99,8	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Clortetraciclina	91,7	Sigma-Aldrich (EUA)
Sulfametoxipiridazina	99,2	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Epitetraciclina	94,3	Acrós Organics (Bélgica)
Sulfamerazina	99,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Epiclortetraciclina	90,4	Acrós Organics (Bélgica)
Sulfisoxazole	99,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Epioxitetraciclina	81,3	Acrós Organics (Bélgica)
Sulfadoxina	99,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Doxiciclina	98	Sigma-Aldrich (Suíça)
Sulfaquinoxalina	96	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Norfloxacin	98	Sigma-Aldrich (EUA)
Sulfametoxazol	99,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Ciprofloxacina	ND*	CDN Isotops (Canadá)
Sulfadimetoxina	99,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Enrofloxacin	99	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Espiramicina	88,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Ácido nalidíxico	99,5	Acrós Organics (Bélgica)
Tilmicosina	86,5	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Sarafloxacin	97,2	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Eritromicina	94	Sigma-Aldrich (EUA)	Ácido oxolínico	98,7	Sigma-Aldrich (Suíça)
Tilosina	87,7	Sigma-Aldrich (Alemanha)	Flumequina	99,9	Sigma-Aldrich (Alemanha)
Clindamicina	99	Sigma-Aldrich (EUA)			

* Não declarado

Durante os procedimentos de otimização do método referenciado (Gaugain-Juhel et al., 2010) foram preparadas, em fase móvel, soluções variando entre 1 e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a partir da solução estoque de alguns analitos, para o processo de otimização da fonte de ionização e para a confirmação das transições que seriam utilizadas para cada analito. As transições foram selecionadas com base no método de referência e, para aquelas cuja resposta analítica apresentou baixa intensidade de sinal ou pouca definição de pico, as soluções de otimização foram utilizadas para infusão direta no espectrômetro de massas. As transições utilizadas para cada analito e as condições de trabalho otimizadas serão apresentadas posteriormente.

Soluções de adição (*pool*)

Soluções de adição foram preparadas a partir de alíquotas das soluções estoque que foram

diluídas em água destilada e deionizada (Milli-Q). Foram preparadas duas soluções de adição distintas contendo o *pool* de analitos que seriam usados nos dois procedimentos de extração (extração por ácido tricloroacético e extração por acetonitrila). Para o grupo das quinolonas e das sulfonamidas, devido às altas concentrações dos analitos nas soluções estoque, foi necessário preparar soluções intermediárias e, posteriormente, alíquotas dessas soluções foram diluídas para o preparo da solução de adição (tabs. 6 e 7).

A concentração dos analitos na solução de adição foi calculada de acordo com o valor do LMR ou do nível de interesse (concentração alvo de triagem) definido para cada analito, levando em consideração o volume da solução de adição que seria acrescentado na amostra durante os procedimentos de extração para a validação do método, que foi de 200 μL .

Tabela 6 - Concentração dos analitos e alíquotas das soluções estoque e intermediária utilizadas no preparo da solução de adição e concentração final do analito na solução de adição, utilizada no processo de extração por ácido tricloroacético - TCA

Analitos	Concentração analito Sol. Estoque ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Volume Sol. Interm. (μL)	Concentração analito Sol. Interm. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Volume Sol. Adição (μL)	Concentração analito Sol. Adição ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Quinolonas					
Norfloxacina	1002,0	249,5			
Ciprofloxacina	1012,0	247,0			
Sarafloxacina	1015,0	246,3			
Ácido oxolínico	1007,0	248,3	5,0	1,0	0,10
Ácido nalidíxico	1021,0	244,9			
Flumequina	1012,0	247,0			
Enrofloxacin	500,0	500,0			
Tetraciclina					
Tetraciclina					
Oxitetraciclina					
Clortetraciclina					
Doxiciclina	200,0	-	-	1,0	4,0
Epitetraciclina					
Epioxitetraciclina					
Epiclortetraciclina					
Aminoglicosídeos					
Espectinomicina					
Estreptomomicina					
Dihidroestreptomomicina					
Gentamicina	200,0	-	-	1,25	5,0
Neomicina					
Apramicina					
Tobramicina					
Higromicina					
Amicacina					
Kanamomicina	19,4	-	-	0,129	0,5
Lincomomicina	100,0	-	-	0,25	

Tabela 7 - Concentração dos analitos e alíquotas das soluções estoque e intermediária utilizadas no preparo da solução de adição e concentração final do analito na solução de adição, utilizada no processo de extração por acetonitrila - ACN

Analitos	Concentração do analito na Solução Estoque ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Volume para preparo da Solução Intermediária (μL)	Concentração do analito na Solução Intermediária ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Volume para preparo da Solução de Adição (μL)	Concentração do analito na Solução de Adição ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Macrolídeos					
Espiramicina					
Eritromicina	100,0	-	-	0,75	1,50
Tilmicosina					
Clindamicina					
Tilosina				1,00	2,00
Sulfonamidas					
Sulfadimetoxina	999,0	500	10,0	0,50	0,10
Sulfatiazol	1000,4	500			
Sulfaquinoxalina	989,5	505			

Cont. tabela 7

Sulfadoxina	958,0	522			
Sulfadiazina	991,0	505			
Sulfisoxazole	1001,4	500			
Sulfametoxazol	1002,6	500	10,0	0,50	0,10
Sulfametazina	1002,0	500			
Sulfamerazina	1000,0	500			
Sulfaclopiridazina	1001,8	500			
Sulfametoxipiridazina	1003,2	500			
Beta-lactâmicos					
Amoxicilina					
Ampicilina					
Penicilina G					
Oxacilina					
Cloxacilina	200,0	-	-	0,125	0,50
Dicloxacilina					
Penicilina V					
Nafcilina					
Cefazolina					

Solução de adição de padrão interno (Sulfafenazol)

Como padrão interno (PI), presente em ambos os procedimentos de extração, foi utilizado o sulfafenazol. Sua escolha foi devido ao não uso do medicamento na rotina da prática veterinária.

Para o preparo da solução de adição do padrão interno foram diluídos 50 µL da solução estoque de sulfafenazol em um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi ajustado com água destilada e deionizada (Milli-Q), resultando em uma concentração final de 1,0 µg.mL⁻¹. Esta solução foi preparada mensalmente e conservada em freezer com temperatura controlada e mantida abaixo de -10°C.

Reagentes e solventes

Para os procedimentos de extração das amostras foram utilizados o ácido tricloroacético – TCA (J.T.Baker 99,9%), o

acetato de amônio (Sigma-Aldrich, 98%), o ácido heptafluorobutírico – HFBA (Fluka

98%) e a acetonitrila - ACN (Suprassolv Merck).

Para o processo de extração por ácido tricloroacético foi utilizada uma solução de TCA a 5% que foi obtida dissolvendo 50 g do ácido tricloroacético em 1 litro de água destilada e deionizada (Milli-Q). Para o processo de extração por acetonitrila foi utilizado para o procedimento de ressuspensão da amostra uma solução 2 mol.L⁻¹ de acetato de amônio que foi preparada dissolvendo 15,4g do acetato de amônio em 100 mL de água destilada e deionizada (Milli-Q). Essa solução foi diluída 10 vezes para obter a concentração de 0,2 mol.L⁻¹.

As fases móveis foram compostas de soluções de HFBA 0,1% e 0,2% preparadas pela adição de 1 e 2 mL do ácido, respectivamente, em 900 mL de água, ajustando o volume para 1 litro.

3.2 Otimização dos Parâmetros Instrumentais

Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial

As condições de trabalho para o sistema cromatográfico e para o detector de massas foram estabelecidas por meio de infusões de soluções padrões dos analitos, preparadas individualmente.

Um sistema de Cromatografia Líquida Ultra Rápida (Prominence UFLC Shimadzu) foi usado para a separação cromatográfica. Com relação ao sistema cromatográfico foram avaliados: coluna do tipo C₁₈, temperatura da coluna, composição da fase móvel e diferentes gradientes para a fase móvel, com base no método de referência LMV/RMV/SM/PTC/04.NA (Gaugain-Juhel et al., 2010).

Nesta validação foi utilizado o espectrômetro de massas triplo quadrupolo/*Ion Trap* Linear (4000 QTRAP®) da AB Sciex equipado com fonte de ionização *electrospray* usada no modo positivo. A aquisição de dados foi feita pelo programa *Analyst*® (versão 1.5.1). A otimização das condições do espectrômetro de massas foi realizada por meio de infusão direta das soluções de padrões que apresentaram menor intensidade de sinal, com o objetivo de obter o maior sinal analítico do íon precursor de cada analito a ser estudado. Posteriormente, os íons precursores foram fragmentados na câmara de colisão para obtenção dos íons-produto e o potencial de desagregação (DP – *potencial declustering*) e a energia de colisão (EC – *collision energy*) foram otimizadas para alguns analitos com o intuito de aumentar a intensidade do sinal. O nitrogênio foi utilizado como gás de colisão possibilitando a análise no modo MRM sendo monitoradas, no mínimo, duas transições (*m/z*) para cada composto. A transição com maior

intensidade (transição 1) foi usada para a identificação e a transição de menor intensidade (transição 2) foi usada para a confirmação do analito. A presença de duas transições com valor de sinal/ruído >3 em combinação com o tempo de retenção garantem a identificação e confirmação dos analitos.

3.3 Procedimentos de Extração

Preparo da Amostra

Os ovos, provenientes da Fazenda da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais localizada em Igarapé/Minas Gerais, de aves que certificadamente não receberam medicamentos na ração, permaneceram em temperatura ambiente até o início do preparo das amostras. Depois de quebrados em recipientes de plástico, os ovos (gema e clara) foram homogeneizados em *Ultra Turrax*. Pesou-se 2,0 ± 0,1 gramas da amostra em tubo de polipropileno de 50 mL que foram mantidas congeladas, em temperaturas inferiores a -10°C, até o momento da análise.

Durante a validação, foram preparadas 40 amostras brancas (20 amostras para cada procedimento de extração), oriundas de ovos diferentes, a fim de verificar a possível ocorrência de supressão ou realce de sinais provocados pela matriz ovo (efeito de matriz).

Otimização dos Procedimentos de Extração

O desafio para uma análise de multirresíduos é encontrar métodos de extração capazes de extrair um grande número de analitos com propriedades químicas diferentes (lipossolubilidade, hidrossolubilidade, características alcalinas e ácidas, dentre outras) e em concentrações variando de acordo com o nível de interesse estabelecido para cada grupo/analito. Pode-

se considerar impossível otimizar procedimentos de *clean-up* para todos os analitos, principalmente quando a etapa de purificação deve ser rápida e simples.

Frente à demanda dos laboratórios de rotina em responder com resultados rápidos e confiáveis a um grande número de amostras, a característica de rapidez exigida para o método de triagem impede a otimização de um processo de extração e *clean-up* para todos os analitos.

Segundo Gaugain-Juhel et al. (2009), no campo de medicamentos veterinários, duas rotas de extração são encontradas quando se utiliza a matriz músculo. A primeira rota seria o uso da extração com acetonitrila para macrolídeos, sulfonamidas, penicilinas e cefalosporinas. A segunda rota seria o uso de uma extração ácida com ácido tricloroacético para os analitos dos grupos das quinolonas, aminoglicosídeos, lincosamidas e tetraciclina.

Dois diferentes processos de extração foram utilizados para permitir a validação do método de triagem multiresíduos e a diferenciação de todos os 50 analitos utilizados (47 antimicrobianos e três epímeros de tetraciclina). A acetonitrila foi o solvente de extração utilizado para extrair os analitos dos grupos das penicilinas, das cefalosporinas, das sulfonamidas e dos macrolídeos. A solução de ácido tricloroacético a 5% foi o meio aquoso ácido utilizado para a extração dos analitos pertencentes aos grupos das tetraciclina, dos aminoglicosídeos, lincosamidas e das quinolonas. Como padrão interno foi utilizado o sulfafenazol em ambos os procedimentos de extração.

Durante os procedimentos de extração por TCA observou-se a necessidade de otimizar o processo de centrifugação das amostras com o objetivo de se obter extratos mais límpidos e com menos interferentes da matriz ovo. Para tanto o procedimento foi

otimizado a partir da análise de amostras de ovo sem adição de analitos (amostras brancas) e amostras adicionadas de padrões dos analitos (amostras fortificadas), além de uma amostra do branco de reagentes. Para a obtenção de um extrato com menos interferente da matriz foi realizada a centrifugação das amostras a aproximadamente 3000xg, a 4°C por cinco e por dez minutos e, a aproximadamente, 14462xg, a 4°C, por 12 minutos em ultracentrífuga.

Extração por Ácido Tricloroacético - TCA

Os tubos de polipropileno, contendo as amostras de ovos, foram retirados do congelador e mantidos em temperatura ambiente até o total descongelamento. As amostras foram fortificadas nas concentrações desejadas (200 µL da solução de padrão interno, 200 µL da solução de adição e 600 µL de água) e agitadas em *vórtex*, permanecendo em repouso por dez minutos. Na sequência, adicionou-se 8 mL da solução de TCA a 5%, com nova agitação do sistema em homogeneizador horizontal por 10 minutos. Foram transferidos para tubos de ultracentrífuga do tipo *Eppendorf*® 1,5 mL do extrato obtido. O sistema foi ultracentrifugado a aproximadamente 14462xg, a 4°C, por 12 minutos. O sobrenadante foi transferido para seringa de 3 mL, filtrado em filtros de membrana PTFE (politetrafluoretileno) 0,22 µm x 13 mm (FilterPro®) em um *vial*, e 20 µL do extrato foi injetado e analisado pelo sistema CL-EM/EM (fig. 7).

Extração por Acetonitrila - ACN

As etapas de descongelamento e adição de padrão interno, solução de adição e água são semelhantes às da extração por TCA. No entanto, foram adicionados 8 mL de acetonitrila. O extrato, após 10 minutos de homogeneização, foi centrifugado a aproximadamente 3000xg, a 4°C, por 10

minutos. Um volume de 6 mL do sobrenadante foi transferido para tubo de vidro e evaporado, sob fluxo de ar, a $40 \pm 3^\circ\text{C}$ em banho de água com agitação até secagem. Ao resíduo foram adicionados 600 μL da solução $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de acetato de

amônio e, após homogeneização em *vórtex*, o extrato foi transferido para seringa de 3 mL, filtrado em membrana PTFE $0,22 \mu\text{m}$ x 13 mm (FilterPro®) em um *vial* com *insert*, e 20 μL do extrato foi injetado e analisado pelo sistema CL-EM/EM (fig. 7).

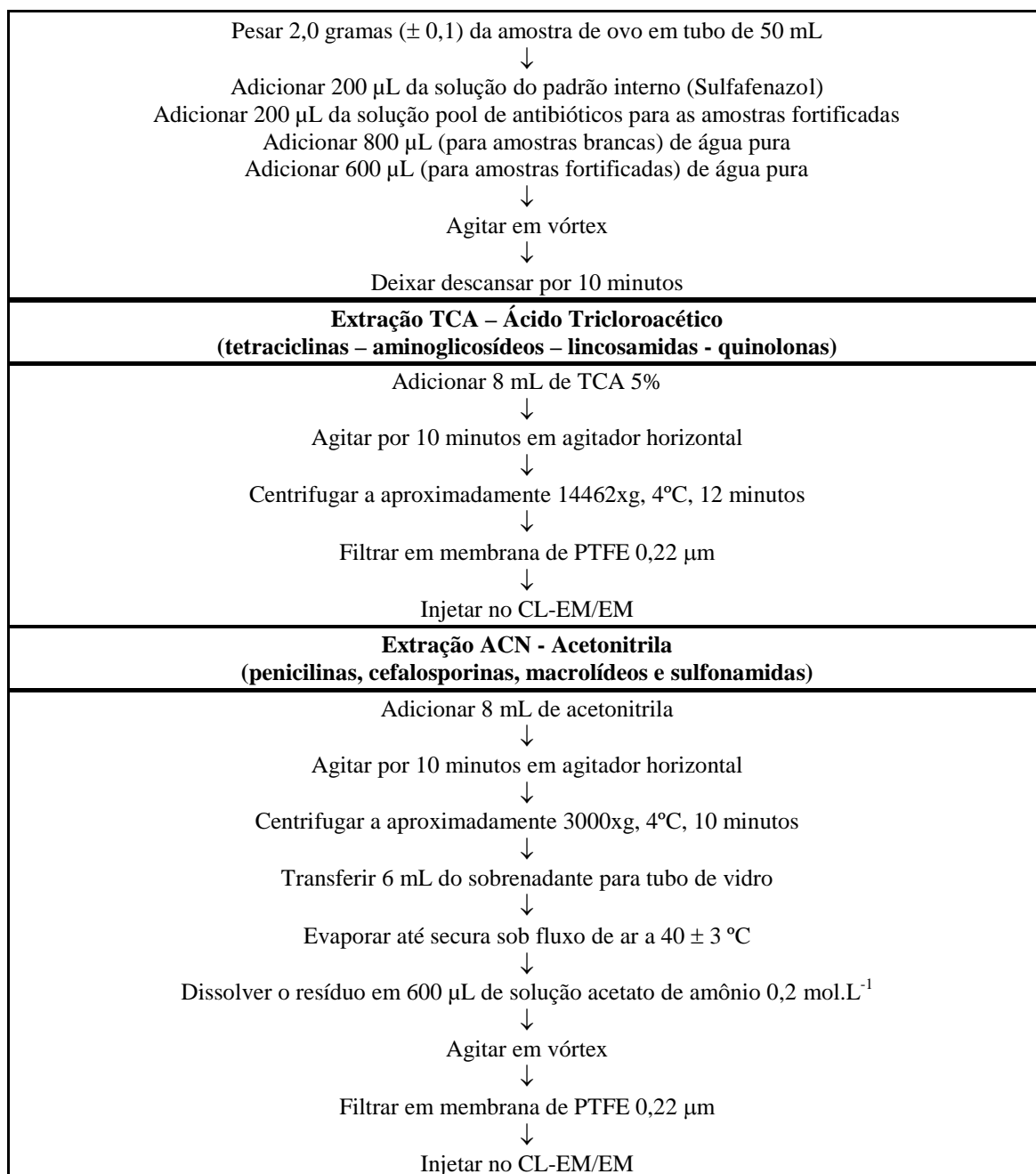


Figura 7 - Representação esquemática dos procedimentos de extração empregados na validação do método multirresíduos.

3.4 Delineamento Experimental da Validação

Os procedimentos de validação adotados estão de acordo com as diretrizes previstas na Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002). As substâncias estudadas pertencem à classe dos beta-lactâmicos, das sulfonamidas, dos macrolídeos, dos aminoglicosídeos e lincosamidas, das tetraciclina e das quinolonas. Para definir a concentração alvo de triagem dos analitos foram utilizados como valores de referência os limites estabelecidos no *Codex Alimentarius*, no Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia e no PNCRC de 2011.

A concentração alvo de triagem foi estabelecida de acordo com o Guia para validação de métodos de triagem (European Commission, 2010):

- Analitos autorizados – concentração alvo de triagem é igual ou inferior ao LMR sendo, de preferência, fixado em metade do LMR sempre que possível.
- Analitos proibidos e não autorizados – concentração alvo de triagem deve ser igual ou menor que o LMDR;

- Analitos sem LMR estabelecido – deve, quando possível, ser igual ou menor que concentrações recomendadas pelos Laboratórios de Referência da Comunidade Europeia.

Dessa forma, utilizou-se o valor do LMR para os analitos que possuem LMR e para os analitos que não possuem LMR estabelecido, mas que no grupo há um analito com LMR, a concentração alvo estabelecida foi a mesma do analito do grupo. Para os grupos que não possuem analitos com LMR estabelecido o valor da concentração alvo de triagem foi baseado na menor resposta analítica obtida por injeções no CL-EM/EM.

Com o objetivo de reduzir o valor da concentração alvo de triagem para os analitos com LMR estabelecido realizou-se a validação em dois níveis diferentes: no nível da concentração alvo de triagem e em 0,75 desse valor. As concentrações dos 50 analitos usados (47 antimicrobianos e três epímeros de tetraciclina) nos procedimentos de validação do método encontram-se na tab. 8.

Tabela 8 – Limite de referência dos analitos estabelecido para a validação do método multirresíduos executada em dois níveis de concentração

Grupos	Analitos	Limite de Referência $\mu\text{g.kg}^{-1}$	0,75 do Limite de Referência $\mu\text{g.kg}^{-1}$
Beta-lactâmicos (7 analitos)	Amoxicilina	50	37,5
	Ampicilina		
	Oxacilina		
	Cloxacilina		
	Dicloxacilina		
	Penicilina G		
	Penicilina V		
Tetraciclina* (7 analitos)	Tetraciclina + epitetraciclina	400	300
	Oxitetraciclina + epiclortetraciclina		
	Clortetraciclina + epiclortetraciclina		
	Doxiciclina		

Cont. tabela 8

Sulfonamidas (11 analitos)	Sulfadimetoxina		
	Sulfatiazol		
	Sulfaquinoxalina		
	Sulfadoxina		
	Sulfadiazina	10	7,5
	Sulfisoxazole		
	Sulfametoxazol		
	Sulfametazina		
	Sulfamerazina		
	Sulfaclorpiridazina		
	Sulfametoxipiridazina		
Aminoglicosídeos (10 analitos)	Espectinomicina		
	Apramicina		
	Gentamicina		
	Estreptomicina		
	Dihidroestreptomicina	500	375
	Tobramicina		
	Neomicina		
	Higromicina		
	Amicacina		
Kanamicina	50	37,5	
Macrolídeos (4 analitos)	Espiramicina		
	Tilmicosina	150	112,5
	Eritromicina		
	Tilosina	200	150
Quinolonas (7 analitos)	Enrofloxacina		
	Flumequina		
	Norfloxacina		
	Ácido Oxolínico	10	7,5
	Ciprofloxacina		
	Ácido nalidíxico		
	Sarafloxacina		
Lincosamidas (2 analitos)	Clindamicina	150	112,5
	Lincomicina	50	37,5
Cefalosporinas (2 analitos)	Cefazolina		
	Nafcilina	50	37,5

* Para a validação das tetraciclina foram utilizados os padrões de epímeros da tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina.

Nota: O limite de referência foi estabelecido com base no disposto no item 1.1.4 para todos os analitos.

3.5 Protocolo de Validação para Método Qualitativo

A identificação de um maior número de analitos com maior sensibilidade realizada em menor tempo de análise é um dos objetivos de se validar métodos de triagem, conseqüentemente, é possível emitir laudos com maior rapidez, pois os resultados são emitidos como conforme (concentração do analito menor que o LMR) ou não conforme (concentração do analito maior que o LMR). Contudo, o desenvolvimento e a otimização de um método multirresíduo exigem

condições de trabalho capazes de extrair um grande número de analitos com características bem distintas de uma mesma matriz.

O processo de validação foi estabelecido de acordo com o *Guide pour La validation des méthodes biologiques de dépistage version 1*, documento interno não publicado (Gaudin & Sanders, 2007) respeitando os critérios da Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002). O objetivo da validação é provar a adequação do método em alcançar o objetivo para o qual ele será utilizado.

Segundo a Decisão 2002/657/CE, métodos qualitativos de análise devem permitir a detecção de todas as substâncias alvo com uma taxa de falsos conformes < 5% (erro β) no nível de interesse. Isso significa que o CC_{β} do método deverá ser encontrado abaixo desse nível de interesse. No caso de suspeito de um resultado não conforme, esse deve ser confirmado por um método de análise confirmatório. Por trabalharmos com duas a três transições por analito e avaliação das respostas nos respectivos tempos de retenção, o método é confirmatório.

Para a validação qualitativa foram determinados os seguintes parâmetros: *Threshold Value* (T_{valor}), limite de detecção (LD), *Cut-off factor* ou Fator de corte (F_c) e Capacidade de detecção ou CC_{β} (Gaugain-Juhel et al., 2009; Moreira, 2012). Tais parâmetros estão em conformidade com as diretrizes para validação de métodos de triagem de resíduos de medicamentos veterinários estabelecidos pelo *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines* dos laboratórios de resíduos de referência da comunidade europeia (*European Commission*, 2010).

Determinação do “Threshold Value” (T_{VALOR})

O primeiro passo para avaliar a capacidade de detecção do método é calcular o T_{valor} para cada composto de interesse. O T_{valor} é o valor limite correspondente à resposta analítica (área) mínima a partir da qual é possível detectar o analito e considerar a amostra verdadeiramente positiva.

Para determinar este parâmetro, 20 amostras brancas (ovos diferentes) foram testadas de acordo com os métodos de extração descritos no item 1.1.3. A resposta analítica do branco (linha de base ou ruído), no tempo de retenção referente a cada analito, foi determinada em cada cromatograma para as duas transições MRM (identificação ou 1ª transição e confirmação ou 2ª transição). O valor da média dos ruídos (B) e a estimativa do desvio padrão referente aos brancos foram calculados (SD_{Br}). O T_{valor} foi estimado a partir do valor da média dos ruídos obtido das 20 amostras analisadas (fig. 8) e calculado de acordo com a equação 01 (Gaugain-Juhel et al., 2010):

$$T_{valor} = B + 1,64 \times SD_B \quad (\text{Eq. 01})$$

Sendo, B e SD_{Br} , respectivamente, a média e o desvio padrão das respostas instrumentais (área dos picos) de amostras brancas no tempo de retenção referente a cada analito.

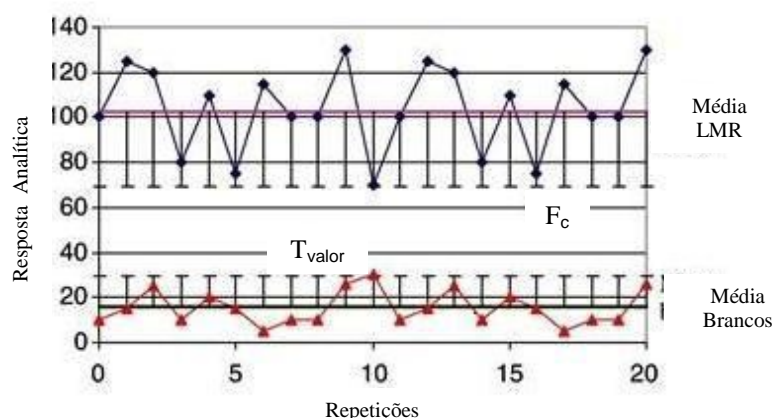


Figura 8 - Representação do T_{valor} e do Fator de Corte.

Determinação do Limite de Detecção (LD)

Existem várias definições e critérios para a estimativa do limite de detecção (LD). O Vocabulário Internacional Metrológico (VIM) o define como um valor quantitativo, obtido por procedimento de medição, para o qual a probabilidade de um resultado falso negativo de um analito em uma amostra é β , dada uma probabilidade de um falso positivo α , sendo que, geralmente $\alpha = \beta = 0,05$. O LD de um procedimento individual analítico também pode ser definido como a menor concentração do analito em uma amostra capaz de ser detectada, mas não necessariamente quantificada, podendo ser estimada por avaliação visual, relação sinal-ruído e desvio padrão da amostra (Moreira, 2012).

Para o cálculo do LD foi considerado o valor da média das respostas das amostras brancas, a concentração conhecida do analito e a média das respostas analíticas das amostras fortificadas na concentração conhecida, e calculado de acordo com a equação 02 (Gaugain-Juhel et al., 2010):

$$LD = \frac{3B * [C]}{M_{an}} \quad (\text{Eq. 02})$$

Sendo, B a média das respostas instrumentais (área dos picos) de amostras brancas no tempo de retenção referente a cada analito, C a concentração conhecida de cada analito e M_{an} a média das respostas analíticas (áreas dos picos cromatográficos) das amostras e das duas transições MRM de cada analito.

Determinação do Fator de Corte (F_c)

O Fator de corte (F_c) ou Nível de corte (N_c) é a resposta analítica que indica que uma amostra contém uma substância com concentração igual ou superior ao nível de interesse. Para determinação deste parâmetro

20 amostras brancas de matriz ovo foram fortificadas nos níveis desejados (LMR e 0,75 do LMR) de todos os analitos. A análise foi repetida em mais dois momentos diferentes, totalizando 60 amostras. Foram calculadas a média e a estimativa do desvio padrão das respostas instrumentais (área do pico) para cada analito ($n=60$) e para as duas transições. Finalmente, F_c foi estimado de acordo com a equação 03 (Gaugain-Juhel et al., 2010):

$$F_c = M_{an} - 1.64 \times SD_{an} \quad (\text{Eq. 03})$$

Sendo, M_{an} e SD_{an} são, respectivamente, a média e o desvio padrão das respostas analíticas (áreas dos picos cromatográficos) das 60 amostras e das duas transições MRM de cada analito. Estatisticamente, espera-se que 95% das amostras fortificadas no nível de interesse estejam com o valor da resposta analítica acima do valor de F_c .

Capacidade de Detecção (CC_β)

De acordo com as diretrizes para validação de métodos de triagem (European Commission, 2010), a capacidade de detecção de métodos qualitativos (CC_β) pode ser avaliada apenas quando o valor do F_c for maior que o T_{valor} , ou seja, a média das respostas analíticas das amostras fortificadas subtraída de 1,64 vezes o valor do desvio padrão é maior que a média das respostas analíticas das amostras brancas acrescidas de 1,64 vezes o desvio padrão da média (Gaugain-Juhel et al., 2009). Dessa forma, os valores de F_c e T_{valor} podem levar a diferentes situações:

- quando o valor do F_c é maior que o T_{valor} : tem-se a melhor situação que corresponde a uma taxa de falso-negativo menor que 5%. Consequentemente, o CC_β é definitivamente menor que o nível de interesse.

- quando o F_c é menor que o T_{valor} : se o T_{valor} for considerado como limite de positividade, então mais que 5% das amostras serão consideradas como negativas e, conseqüentemente, CC_β esta realmente acima do nível de interesse. Desta forma, o nível de concentração alvo de triagem deverá ser maior ao utilizado.

Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito sendo dependente do analito e da técnica de detecção utilizada (Moreira, 2012). Pode ser determinada como sendo o número de positivos dividido pelo número de amostras verdadeiramente positivas, expressas como porcentagem. Uma amostra é considerada positiva desde que o sinal esteja acima do T_{valor} . Uma sensibilidade acima de 95% significa que o CC_β está abaixo do nível de concentração testado na validação e o número de falso-negativos é verdadeiramente menor que 5%.

Para determinar a sensibilidade do método, as respostas instrumentais (área do pico), de 20 amostras brancas fortificadas na concentração alvo de interesse foram comparadas com o F_c . Quando a resposta analítica da amostra era maior que o F_c a amostra foi considerada não conforme, isto é, com uma concentração superior à concentração de interesse, ou seja, positiva. Se a resposta analítica encontrada fosse menor que o valor de F_c , então, a amostra seria considerada conforme, isto é, com uma concentração inferior à do nível de interesse. Assim, a sensibilidade do método foi estimada a partir da equação 04 (Gaugain-Juhel et al., 2010):

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de amostras consideradas positivas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de amostras positivas}} \quad (\text{Eq. 04})$$

A fig. 9 ilustra o delineamento utilizado no processo de validação do método de multirresíduos apresentando as concentrações alvo de triagem utilizadas e o número total de amostras por procedimento de extração.

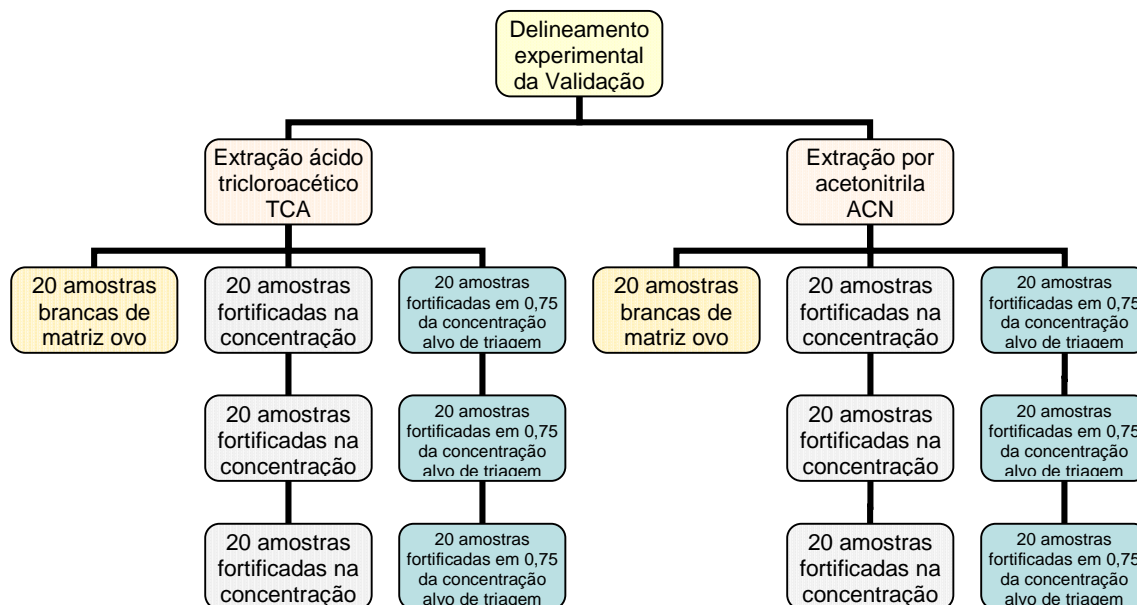


Figura 9 - Representação esquemática do delineamento experimental da validação e do número total de amostras por método de extração.

4. Resultados e Discussão

4.1 Otimização dos Parâmetros Instrumentais e de Extração

Otimização dos Parâmetros Instrumentais

As condições cromatográficas e espectrométricas foram baseadas no método de Referência LMV/RMV/SM/PTC/04. AN, versão 3 (Gaugain-Juhel et al., 2010) e otimizadas de modo a maximizar a resposta analítica dos compostos de interesse que apresentavam baixa intensidade de sinal.

As separações cromatográficas foram realizadas empregando-se coluna Agilent - Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 30 mm, 3.5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent Eclipse XDB C-18 (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). A temperatura da coluna foi fixada em 35 °C, com máxima de 40°C. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar a 5,5 kV e temperatura da fonte a 650°C. A variação da pressão das bombas A e B foi de 0 a 300 Bars (valor médio de 110 Bars), com um fluxo total de 0,6 mL.min⁻¹, iniciando com 10% do solvente B (Tab. 10)

e um volume de injeção de 20 µL para ambas as extrações. O tempo de corrida total foi de 13 minutos para a extração por ácido tricloroacético (TCA) e de 16 minutos para a extração por acetonitrila (ACN).

A eluição dos analitos no sistema cromatográfico consistiu de um gradiente composto de duas fases: fase móvel A composta por 0,1% de ácido heptafluorobutírico em água, e a fase móvel B composta por acetonitrila, utilizados para a injeção dos extratos extraídos pelo método de ACN (acetonitrila). Com relação ao uso das mesmas fases para os extratos extraídos pelo método de TCA, mesmo podendo provocar um efeito de supressão iônica na ionização por *electrospray*, sua utilização foi preferível devido às suas propriedades vantajosas de pareamento de íons que permite incluir bases fortes, como os aminoglicosídeos. Contudo, na concentração de 0,1% não houve boa resposta dos analitos desse grupo e, conseqüentemente, várias infusões foram realizadas com o intuito de melhorar as condições instrumentais. O melhor resultado de sinal foi obtido com a alteração da concentração do HFBA para 0,2% para a extração por TCA (tab. 9).

Tabela 9 - Gradientes das fases móveis em função do tempo de corrida utilizados na validação do método multirresíduos, empregando extração por acetonitrila (ACN) e por ácido tricloroacético (TCA)

Extração por ACN			Extração por TCA		
Tempo de corrida (minuto)	Fase móvel A ^a (%)	Fase móvel B ^b (%)	Tempo de corrida (minuto)	Fase móvel A ^c (%)	Fase móvel B ^b (%)
0,01	90	10	0,01	90	10
4,0	70	30	7	50	50
5,0	70	30	11	50	50
8,0	30	70	12	90	10
11,0	30	70	13	90	10
13,0	90	10	13,1		Stop
16,0	90	10			
16,1		Stop			

^a 0,1% de ácido heptafluorobutírico em água. ^b acetonitrila. ^c 0,2% de ácido heptafluorobutírico em água.

As condições de trabalho do espectrômetro de massas foram estabelecidas com a infusão direta dos analitos que apresentaram problemas na intensidade do sinal e após os testes de otimização o espectrômetro de

massas foi operado em modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) *Scheduled*, com janela de detecção de 60 segundos. A ionização por *electrospray* foi realizada no modo positivo para todos os analitos e o

potencial de entrada (EP) foi de 10 volts. Nitrogênio foi usado como gás de colisão (CAD) e gás de dessolvatação (CUR) às pressões de 8,0 e 20,0 psi, respectivamente. Ar sintético ultrapuro foi empregado como gás nebulizante (GS1) e como gás secante aquecido (GS2) à pressão de 50 psi.

Os fragmentos usados para a determinação em modo MRM para o íon precursor e íons produto, o potencial de desagregação (DP), a energia de colisão (CE), o potencial de saída da célula de colisão (CXP) e o tempo de retenção para cada transição estão apresentados nas tabs. 10 e 11.

Tabela 10 - Transições MRM e condições espectrométricas utilizadas para cada analito extraído pelo método de ácido tricloroacético com base no método de referência e após os testes de otimização

Analitos	DP (V)	1ª Transição (m/z)	CE (V)	2ª Transição (m/z)	CE (V)	3ª Transição (m/z)	CE (V)	CXP* (V)	TR
Norfloxacina	60	320/302	33	320/231	50	-	-	12	4.7
Ciprofloxacina	61	332/314	30	332/231	47	-	-	12	4.8
Sarafloxacina	50	386/368	30	386/348	40	-	-	12	5.6
Ácido oxolínico	53	262/244	25	262/216	40	-	-	12	5.4
Ácido nalidíxico	42	233/215	30	233/187	35	-	-	12	6.8
Flumequina	44	262/244	25	262/202	45	-	-	12	7.0
Enrofloxacin	72	360/342	30	360/286	50	-	-	12	5.2
Tetraciclina	55	445/410	27	445/427	25	-	-	12	5.2
Oxitetraciclina	41	461/201	59	461/283	53	-	-	12	4.9
Clortetraciclina	61	479/98	67	479/275	55	-	-	12	6.0
Doxiciclina	55	445/428	25	445/154	40	-	-	12	6.3
Espectinomicina	66	351/207	31	351/189	33	-	-	12	3.6
Estreptomycin	157	582/263	45	582/246	51	582/407	54	12	4.3
Dihidroestreptomycin	120	584/263	42	584/246	54	584/409	4	12	4.3
Gentamicin	50	478/157	25	464/322	20	464/160	20	12	5.5
Neomicin	120	615/161	41	615/296	35	-	-	8/18	5.9
Apramicin	82	540/217	35	540/378	25	-	-	12	5.2
Tobramicin	50	468/163	20	468/324	55	-	-	12/11	5.3
Higromicin	50	528/177	25	528/352	25	-	-	12	4.2
Amicacin	60	586/425	21	586/163	53	-	-	20/14	4.8
Kanamicin	70	485/163	35	485/205	35	-	-	12	4.8
Lincomicin	60	407/126	40	407/359	26	-	-	12	4.3
Sulfafenazol (PI)*	50	315/156	-	-	-	-	-	12	6.0

* Padrão Interno

Nota: MRM – “Multiple Reaction Monitoring”; DP - potencial de desagregação; CE - energia de colisão; CXP* - potencial de saída da célula de colisão, que variou para as duas transições, em alguns analitos; V – volts; m/z – razão massa/carga; TR – tempo de retenção.

Tabela 11 - Transições MRM e condições espectrométricas utilizadas para cada analito extraído pelo método de acetonitrila com base no método de referência e após os testes de otimização

Analitos	DP (V)	1ª Transição (m/z)	CE (V)	2ª Transição (m/z)	CE (V)	3ª Transição (m/z)	CE (V)	CXP (V)	TR
Espiramicina	56	422/174	31	422/101	25	-	-	16/8	7.4
Eritromicina	66	734/158	43	734/576	27	-	-	14/8	7.6
Tilmicosina	56	869/174	63	869/696	57	-	-	10/34	7.8
Clindamicina	75	425/126	43	425/377	27	-	-	22/10	6.9
Tilosina	115	916/174	55	916/772	43	-	-	6/20	7.8
Sulfadimetoxina	50	311/156	23	311/108	37	-	-	12	6.1
Sulfatiazol	53	256/156	20	256/108	34	-	-	12	3.1
Sulfaquinoxalina	50	301/156	23	301/108	40	-	-	12	6.2
Sulfadoxina	60	311/156	25	311/108	40	-	-	12	5.0
Sulfadiazina	53	251/156	22	251/108	30	-	-	12	2.6
Sulfisoxazole	46	268/156	21	268/113	23	-	-	12	5.4
Sulfametoxazol	60	254/108	35	254/92	35	-	-	12	5.0
Sulfametazina	50	279/156	25	279/108	36	-	-	12	3.6
Sulfamerazina	60	265/92	35	265/156	35	-	-	12	3.1
Sulfaclopiridazina	51	285/156	21	285/92	39	-	-	12	4.6
Sulfametoxipiridazina	60	281/156	25	281/108	35	-	-	12	4.0
Amoxicilina	52	366/349	13	366/114	34	366/208	20	4	3.9
Ampicilina	50	350/106	20	350/160	20	-	-	12	5.1
Penicilina G	70	335/176	21	335/160	21	335/114	37	10/20	7.3
Oxacilina	50	402/160	18	402/243	18	-	-	12	8.0
Cloxacilina	50	436/160	20	436/277	20	-	-	12	8.3
Dicloxacilina	50	470/160	20	470/311	20	-	-	12	8.6
Penicilina V	66	351/160	15	351/192	17	-	-	8/12	7.7
Nafcilina	50	415/199	20	415/171	50	-	-	12	8.4
Cefazolina	50	455/323	15	455/156	23	-	-	12	4.1
Sulfafenazol (PI)**	50	315/156	23	-	-	-	-	12	6.5

**Padrão Interno

Nota: MRM – “Multiple Reaction Monitoring”; TCA – ácido tricloroacético; DP - potencial de desagregação; CE - energia de colisão; CXP* - potencial de saída da célula de colisão, que variou para as duas transições, em alguns analitos; V – volts; m/z – razão massa/carga; TR – tempo de retenção.

Para cada analito foi avaliado o perfil dos íons gerados no espectrômetro com base na intensidade relativa dos mesmos, que representa a razão da resposta instrumental do íon de menor intensidade pela resposta do íon de maior intensidade, em porcentagem. Segundo a Decisão 2002/657/CE (*European Commission*, 2002) as intensidades relativas dos íons detectados devem obedecer às tolerâncias estabelecidas quando se utiliza determinação por espectrometria de massas com fragmentação de íon precursor (tab. 12).

A razão entre os íons de cada analito para cada amostra extraída por ácido tricloroacético e acetonitrila foi avaliada. Os dados da média geral da razão entre os íons calculados para todas as respostas analíticas (60 respostas analíticas por analito por procedimento de extração) obtidas no procedimento de validação executado no nível de 0,75 da concentração alvo de triagem (item 1.1.4, tab. 9) estão reportados nas tabs. 13 e 14.

Tabela 12 - Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas dos íons usando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

Intensidade relativa (% pico base)	CL-EM
>50 %	± 20%
>20% - 50%	± 25%
>10% - 20%	± 30%
≤10%	± 50%

Fonte: *European Commission*, 2002.

Legenda: CL-EM: Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas.

Tabela 13 - Determinação e avaliação da intensidade relativa dos íons estudados para os analitos extraídos por ácido tricloroacético, segundo os valores de tolerância máximos definidos pela Decisão 2002/657/CE

Analitos	Média geral (%)	Desvio Padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Tolerâncias máximas permitidas (%) *	Avaliação
Quinolonas					
Norfloxacina	26,9	4,2	15,7	±25%	Aceitável
Ciprofloxacina	79,9	12,15	15,2	±20%	Aceitável
Sarafloxacina	5,8	2,2	37,8	±50%	Aceitável
Ácido oxolínico	17,1	1,6	9,6	±30%	Aceitável
Ácido nalidíxico	96,2	2,9	3,0	±20%	Aceitável
Flumequina	9,6	1,5	15,5	±50%	Aceitável
Enrofloxacina	28,2	5,28	18,7	±25%	Aceitável
Tetraciclinas					
Tetraciclina	25,9	2,1	8,2	±25%	Aceitável
Oxitetraciclina	50,1	4,1	8,2	±20%	Aceitável
Clortetraciclina	84,4	5,0	5,9	±20%	Aceitável
Doxiciclina	5,8	0,6	9,7	±50%	Aceitável
Aminoglicosídeos					
Espectinomicina	52,1	2,6	4,9	±20%	Aceitável
Estreptomomicina	55,1	7,4	13,2	±20%	Aceitável
Dihidroestreptomomicina	33,1	3,2	9,7	±25%	Aceitável

Cont. tabela 13

Gentamicina	132,5	20,1	15,1	±20%	Aceitável
Neomicina	25,9	2,7	10,4	±20%	Aceitável
Apramicina	112,6	13,3	11,8	±20%	Aceitável
Tobramicina	7,4	2,0	26,6	±50%	Aceitável
Higromicina	207,4	19,9	9,6	±20%	Aceitável
Amicacina	374,9	52,7	14,0	±20%	Aceitável
Kanamicina	45,5	5,7	12,4	±25%	Aceitável
Lincomicina	8,2	0,7	8,2	±50%	Aceitável

*Fonte: European Commission, 2002.

Tabela 14 - Determinação e avaliação da intensidade relativa dos íons estudados para os analitos extraídos por acetonitrila, segundo os valores de tolerância máximos definidos pela Decisão 2002/657/CE

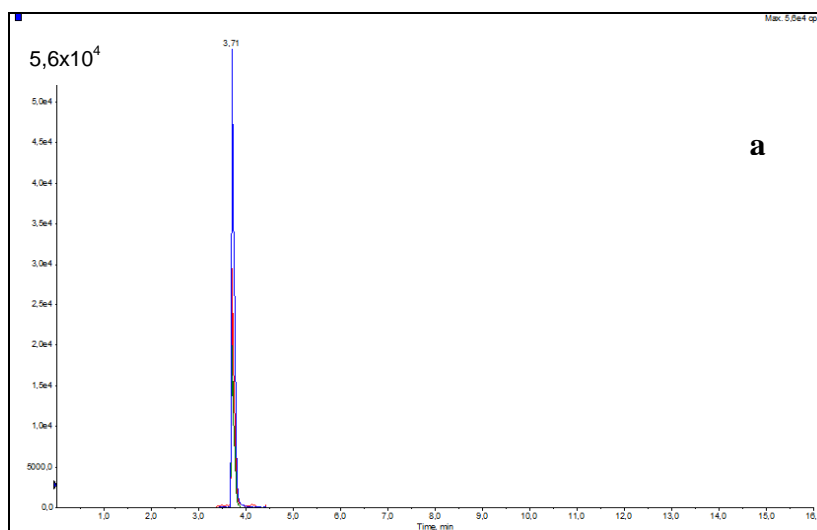
Analitos	Média geral (%)	Desvio Padrão (%)	Coefficiente de Variação (%)	Tolerâncias máximas permitidas (%) *	Avaliação
Macrolídeos					
Espiramicina	65,7	8,4	12,8	±20%	Aceitável
Eritromicina	50,3	2,0	4,1	±20%	Aceitável
Tilmicosina	61,1	3,4	5,6	±20%	Aceitável
Clindamicina	8,9	0,3	3,5	±50%	Aceitável
Tilosina	35,1	1,4	4,1	±25%	Aceitável
Sulfonamidas					
Sulfadimetoxina	30,8	1,5	4,7	±25%	Aceitável
Sulfatiazol	33,6	1,5	4,4	±25%	Aceitável
Sulfaquinoxalina	33,6	1,3	3,7	±25%	Aceitável
Sulfadoxina	30,8	1,5	4,7	±25%	Aceitável
Sulfadiazina	39,2	3,4	8,6	±25%	Aceitável
Sulfisoxazole	59,8	5,0	8,4	±20%	Aceitável
Sulfametoxazol	117,3	9,5	8,1	±20%	Aceitável
Sulfametazina	76,8	3,2	4,2	±20%	Aceitável
Sulfamerazina	44,6	3,0	6,7	±25%	Aceitável
Sulfaclorpiridazina	39,4	1,8	4,6	±25%	Aceitável
Sulfametoxipiridazina	40,7	2,0	4,9	±25%	Aceitável
Beta-lactâmicos					
Amoxicilina	96,7	75,4	78,0	±20%	Inaceitável
Ampicilina	116,7	206,6	177,1	±20%	Inaceitável
Penicilina G	103,7	11,2	10,8	±20%	Aceitável
Oxacilina	105,4	9,3	8,8	±20%	Aceitável
Cloxacilina	120,5	7,2	6,0	±20%	Aceitável
Dicloxacilina	65,9	4,2	6,3	±20%	Aceitável
Penicilina V	9,9	3,1	31,2	±50%	Aceitável
Nafcilina	31,4	0,9	2,8	±25%	Aceitável
Cefazolina	53,6	3,3	6,2	±20%	Aceitável

*Fonte: European Commission, 2002.

Todos os analitos estudados apresentaram a razão dos íons dentro das faixas de tolerâncias estabelecidas pela Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002), exceto a amoxicilina e a ampicilina que não apresentaram tal desempenho, pois os coeficientes de variação das médias gerais calculadas de 78 e 177,1 para a amoxicilina e ampicilina, respectivamente, apresentaram valores bastante superiores à tolerância máxima permitida, que é de 20%. Dessa forma, a razão entre os íons utilizados para esses analitos não demonstraram um perfil dentro do esperado, o que reduz a confiabilidade do uso dos mesmos para a identificação dos analitos, quando se usa a concentração de $37,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para a triagem. Contudo, as condições experimentais estabelecidas para esse método foram consideradas satisfatórias para os demais analitos, pois os picos apresentaram boa resolução e o perfil, estando dentro do esperado e cumprindo com os limites máximos estabelecidos pela Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002)

permite o uso das transições para a identificação segura dos analitos.

Com relação à amoxicilina, quando usada no *pool* de analitos e injetada sem a presença de matriz (padrão direto), apresentou picos cromatográficos com boa resolução e intensidade de sinal. No entanto, nos experimentos que envolveram a adição do *pool* de analitos às amostras brancas (presença de matriz ovo), a amoxicilina apresentou um perfil cromatográfico diferenciado para todas as transições utilizadas no processo de validação, resultantes de um processo de degradação do analito. Na fig. 10 é possível verificar a diferença na conformação do pico da amoxicilina quando injetada no *pool* de analitos, mas sem a presença de matriz ovo e com a presença de matriz. Nas figs. 11 e 12 estão apresentados os picos resultantes de uma injeção da amoxicilina sem a presença de matriz ovo na amostra e com a presença da matriz ovo demonstrando a irregularidade do pico do analito com a presença da matriz.



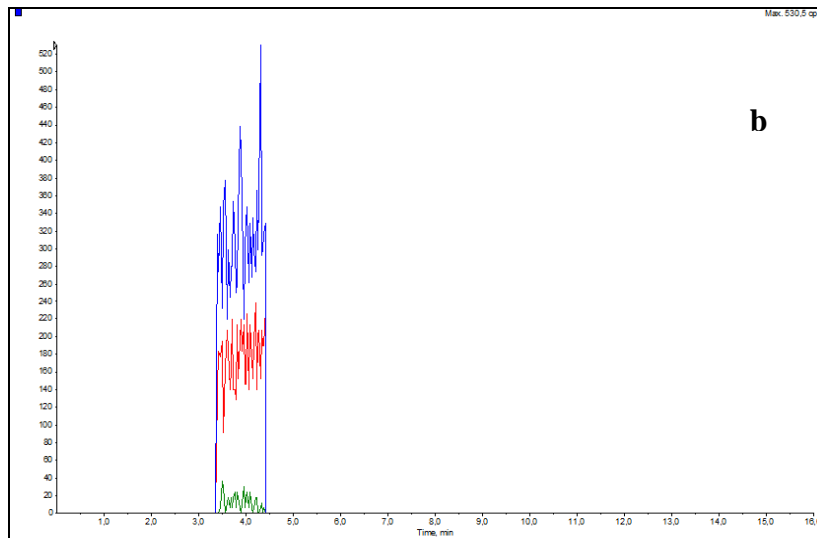


Figura 10 – Cromatogramas das três transições da amoxicilina quando injetada no *pool* de analitos sem a presença da matriz ovo (a) e com a presença da matriz ovo (b).

Nota: Cromatogramas extraídos diretamente do Programa *Analyst*, versão 1.5.1.

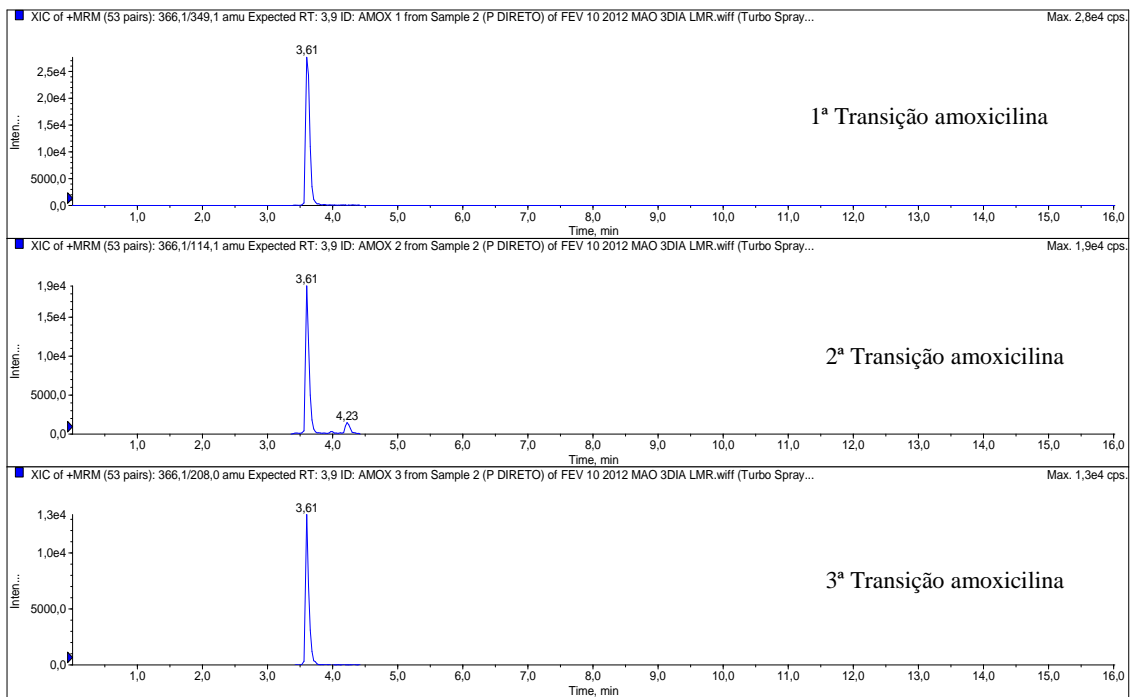


Figura 11 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, das três transições da amoxicilina quando injetada no *pool* de analitos sem a presença da matriz ovo.

Nota: Cromatogramas extraídos diretamente do Programa *Analyst*, versão 1.5.1.

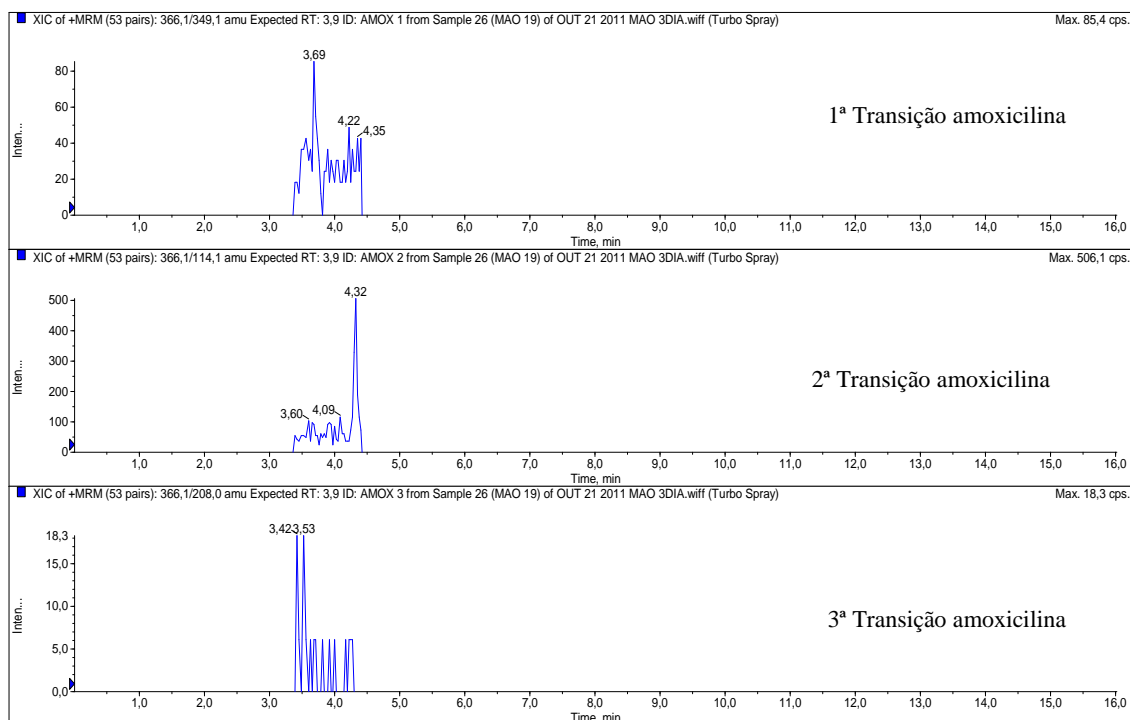


Figura 12 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, das três transições da amoxicilina na presença de matriz ovo.

Nota: Cromatogramas extraídos diretamente do Programa *Analyst*, versão 1.5.1.

O formato dos picos da amoxicilina em amostra branca de matriz ovo adicionada de padrões resultou no comprometimento da resposta deste analito ao longo de todo o processo de validação. Em experimento de validação de beta-lactâmicos, Almeida (2011) obteve resultados semelhantes no perfil cromatográfico da amoxicilina, contudo, o procedimento de validação foi realizado com matriz rim o que demonstra ser um comportamento do analito independente da matriz usada. Segundo o autor, a diferença no formato dos picos se deve ao fato de que este analito possui estabilidade relativamente baixa. Para Reynolds et al. (2008), a conversão da amoxicilina nos metabólitos ácido amoxiléico e dicetopiperazina-2,5-diona, principalmente em condições extremas de pH, pode ser uma explicação. Além disso, o uso de solventes orgânicos como acetonitrila e metanol deve ser evitado na extração da amoxicilina, pois favorecem a degradação da mesma (Oka et al., 1995). Bogialli et al. (2004), para

extração da amoxicilina, utilizaram água à temperatura de 65°C e pH 3, obtendo recuperações de 90% para amoxicilina e ampicilina, contudo, essas condições podem comprometer a determinação dos demais beta-lactâmicos.

A ampicilina não apresentou o mesmo comportamento em seus picos cromatográficos gerados na validação que usou 0,75 da concentração alvo de triagem, contudo, houve uma variação na intensidade do sinal entre as amostras, em um mesmo dia de validação e em diferentes momentos do processo com grandes diferenças nas razões entre íons que acarretaram em alto coeficiente de variação (tab. 15). Desta forma, o coeficiente de variação das médias geradas ficou fora do limite de tolerância estabelecido pela Decisão 2002/657/CE que é de 20% para intensidades relativas superiores a 50% (European Commission, 2002).

Tabela 15 – Percentual de intensidade relativa dos íons estudados para a ampicilina ao longo dos três diferentes momentos do processo de validação – extração por acetonitrila

Amostras	1º momento (%)	2º momento (%)	3º momento (%)
MAO1	52,2	58,9	78,9
MAO 2	43,1	64,1	315,4
MAO 3	46,3	57,5	67,8
MAO 4	41,3	61,4	49,1
MAO 5	42,5	55,4	1310,9
MAO 6	45,1	65,8	383,5
MAO 7	45,9	60,4	212,8
MAO 8	48,0	61,8	51,3
MAO 9	45,9	53,7	49,6
MAO 10	51,8	52,4	50,4
MAO 11	42,5	52,2	53,3
MAO 12	43,9	54,2	163,2
MAO 13	45,3	54,7	45,8
MAO 14	46,3	54,5	658,8
MAO 15	47,9	52,4	237,2
MAO 16	45,5	56,7	45,7
MAO 17	38,6	54,8	48,5
MAO 18	736,8	53,6	49,5
MAO 19	41,3	48,0	355,5
MAO 20	46,9	49,8	52,9
Média Geral (%)	79,9	56,1	214,0
Desvio Padrão (%)	154,7	4,7	305,5
Coefficiente de Variação (%)	193,7	8,4	142,8
Tolerâncias Máximas*	±20%	±20%	±20%
Avaliação	Inaceitável	Aceitável	Inaceitável

*Fonte: European Commission, 2002.

Nota: MAO – (Multirresíduo – Acetonitrila – Ovo) - Sigla de identificação do método em validação/método de extração/matriz usada.

Momento – dias diferentes de injeção das 20 amostras que totalizaram 60 amostras injetadas, por procedimento de extração.

Se reportássemos apenas os dados de razão entre íons do ensaio de recuperação do segundo momento (segundo dia de injeção) teríamos valores compatíveis com a tolerância estabelecida pela Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002). A análise da razão entre os íons da ampicilina no primeiro momento da validação (primeiro dia) demonstra um valor de intensidade para a amostra 18, bem distinta dos demais. Esse fato não ocorreu no segundo momento da validação, mas voltou a ocorrer no terceiro momento do processo de validação o que resultou nas respostas inaceitáveis para o primeiro e terceiro momento e aceitável para o segundo momento.

A fig. 13 ilustra os cromatogramas, gerados na condição de trabalho da validação, e os picos cromatográficos da primeira transição da ampicilina nos quais é possível verificar pelo eixo y a variação significativa na intensidade do sinal do analito.

Cada cromatograma foi gerado por diferentes amostras (MAO 04 E MAO 18) que faziam parte de um mesmo momento da validação, composto por 20 amostras brancas fortificadas no mesmo nível de concentração e injetadas no CL-EM/EM..

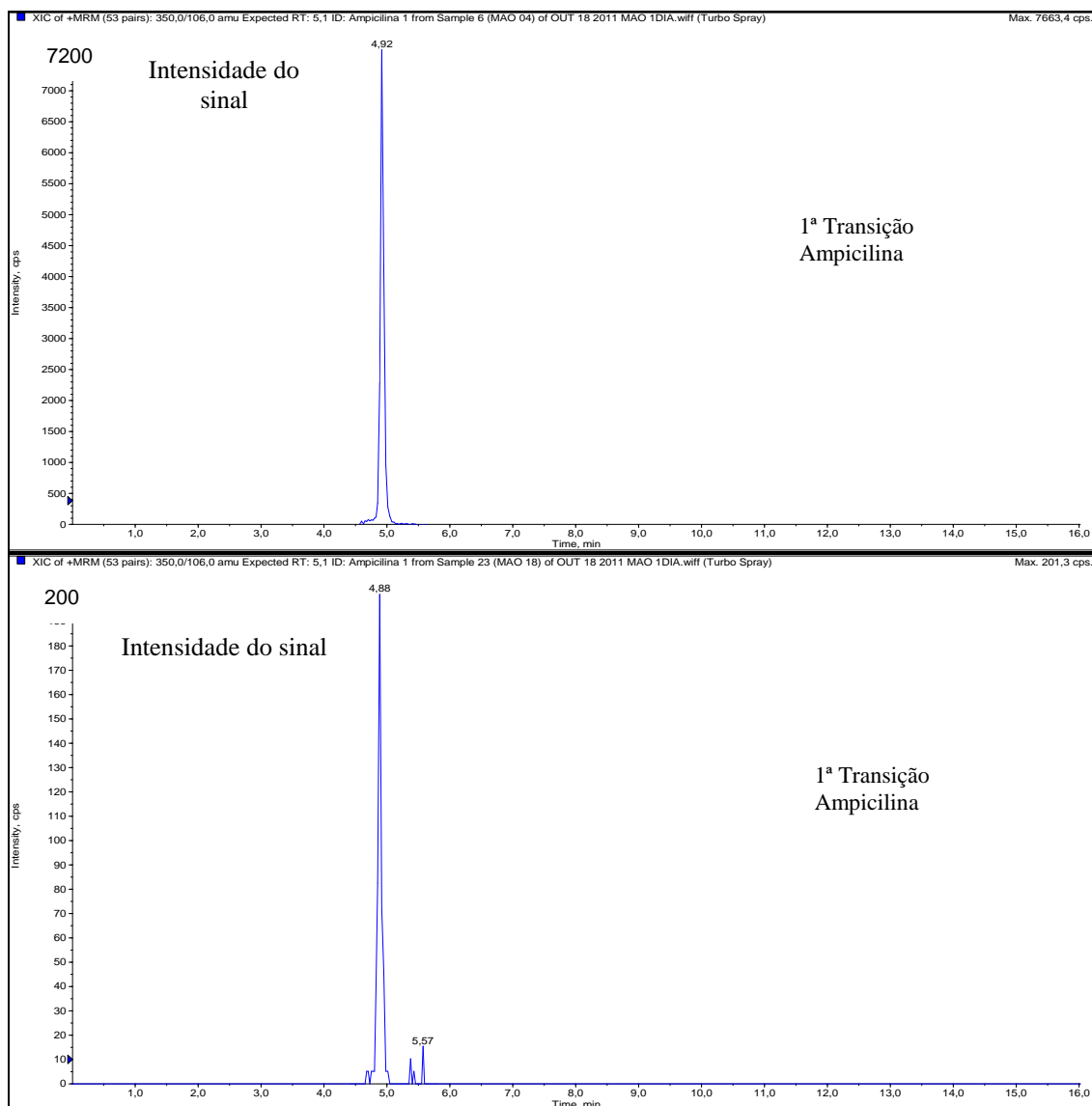


Figura 13 - Cromatogramas gerados por diferentes amostras, injetadas no equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas, em um mesmo dia de validação para a ampicilina.

Nota: Cromatogramas extraídos diretamente do Programa *Analyst*, versão 1.5.1.

A análise dos resultados da ampicilina para a validação realizada no valor de concentração alvo de triagem demonstra adequação segundo a Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002). A média geral das respostas analíticas nos três momentos da validação foi de 40,4% com um desvio padrão de 3,9% e um coeficiente de variação igual a 9,7%. Espera-se um valor de tolerância máxima de $\pm 25\%$, ou seja, para a validação realizada na concentração de 50

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a razão entre os íons obedeceu ao limite de tolerância.

Os cromatogramas apresentados a seguir foram obtidos do Programa *Analyst*, versão 1.5.1 e representam todos os analitos extraídos pelo ácido tricloroacético e uma transição de cada analito estudado, ilustrando os formatos dos picos e o tempo de retenção nas condições de trabalho da validação. Os sinais apresentados são

oriundos da injeção de uma solução de
adição (*pool* dos analitos) na concentração

alvo de triagem sem a presença de matriz
ovo.

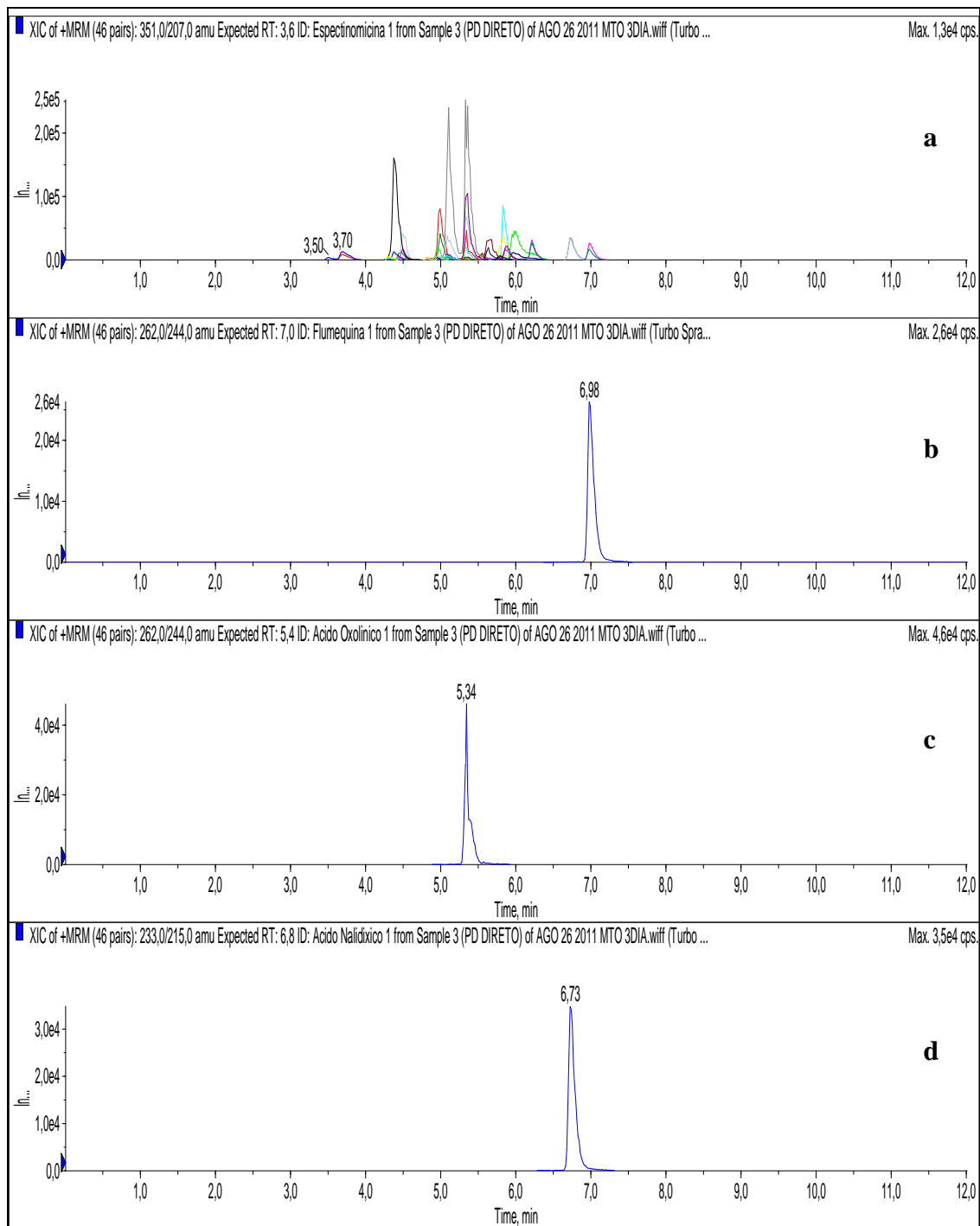


Figura 14 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, de todos os analitos extraídos pelo ácido tricloroacético (a) e da primeira transição dos analitos flumequina (b), ácido oxolínico (c) e ácido nalidíxico (d).

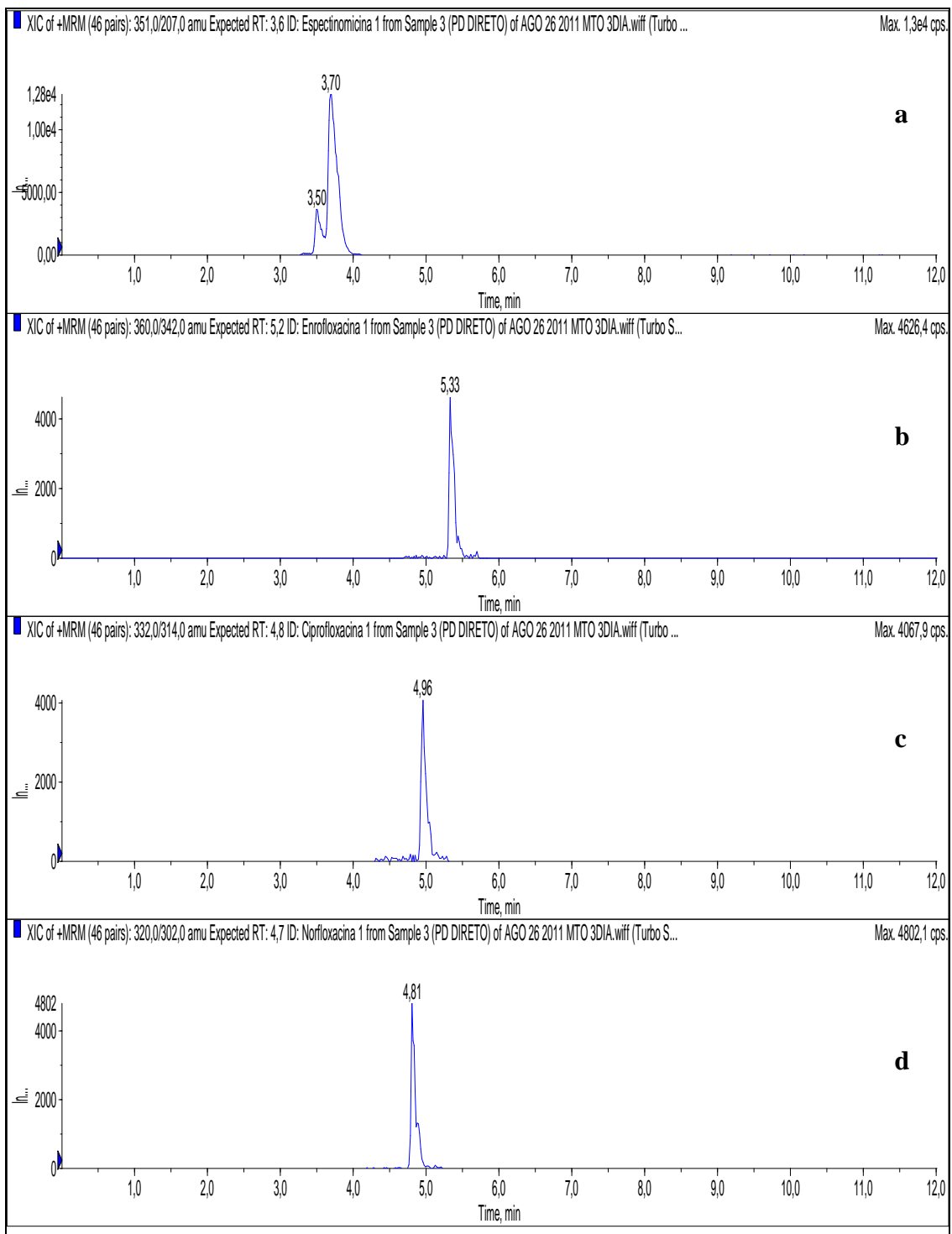


Figura 15 - Cromatogramas nas condições de trabalho da validação da primeira transição dos analitos espectinomicina (a), enrofloxacina (b), ciprofloxacina (c) e norfloxacina (d).

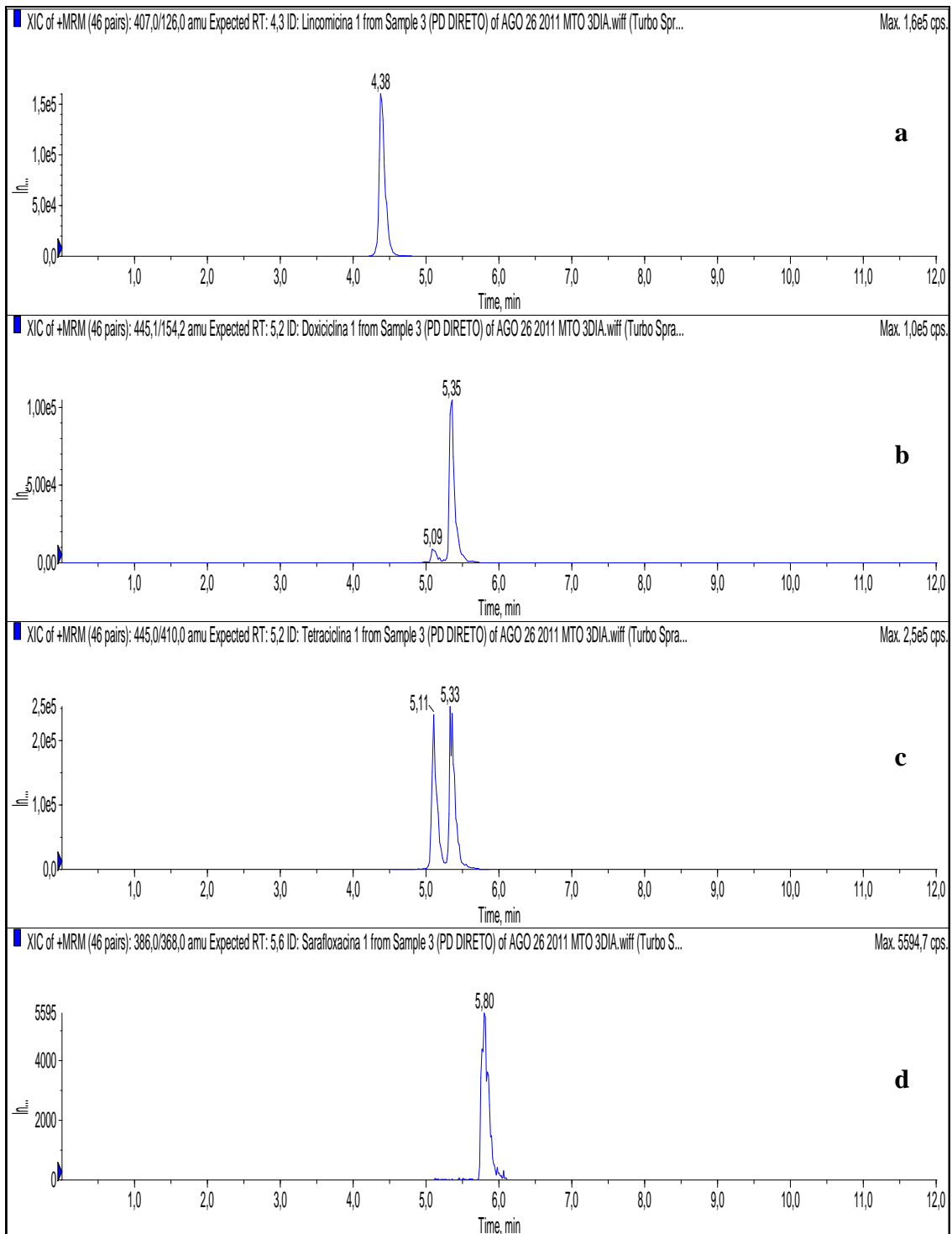


Figura 16 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos lincomicina (a), doxiciclina (b), tetraciclina (c) e sarafloxacina (d).

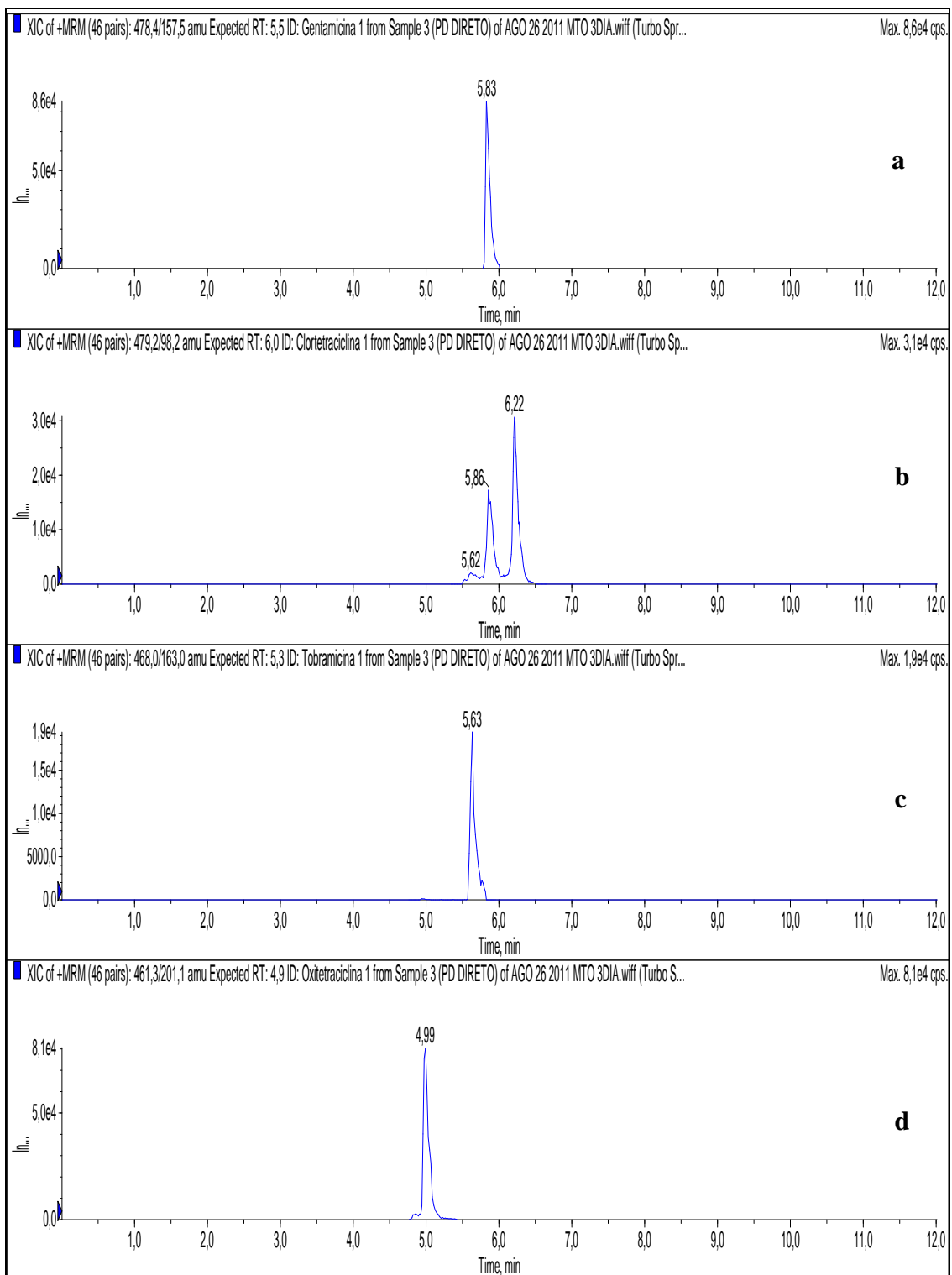


Figura 17 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos gentamicina (a), clortetraciclina (b), tobramicina (c) e oxitetraciclina (d).

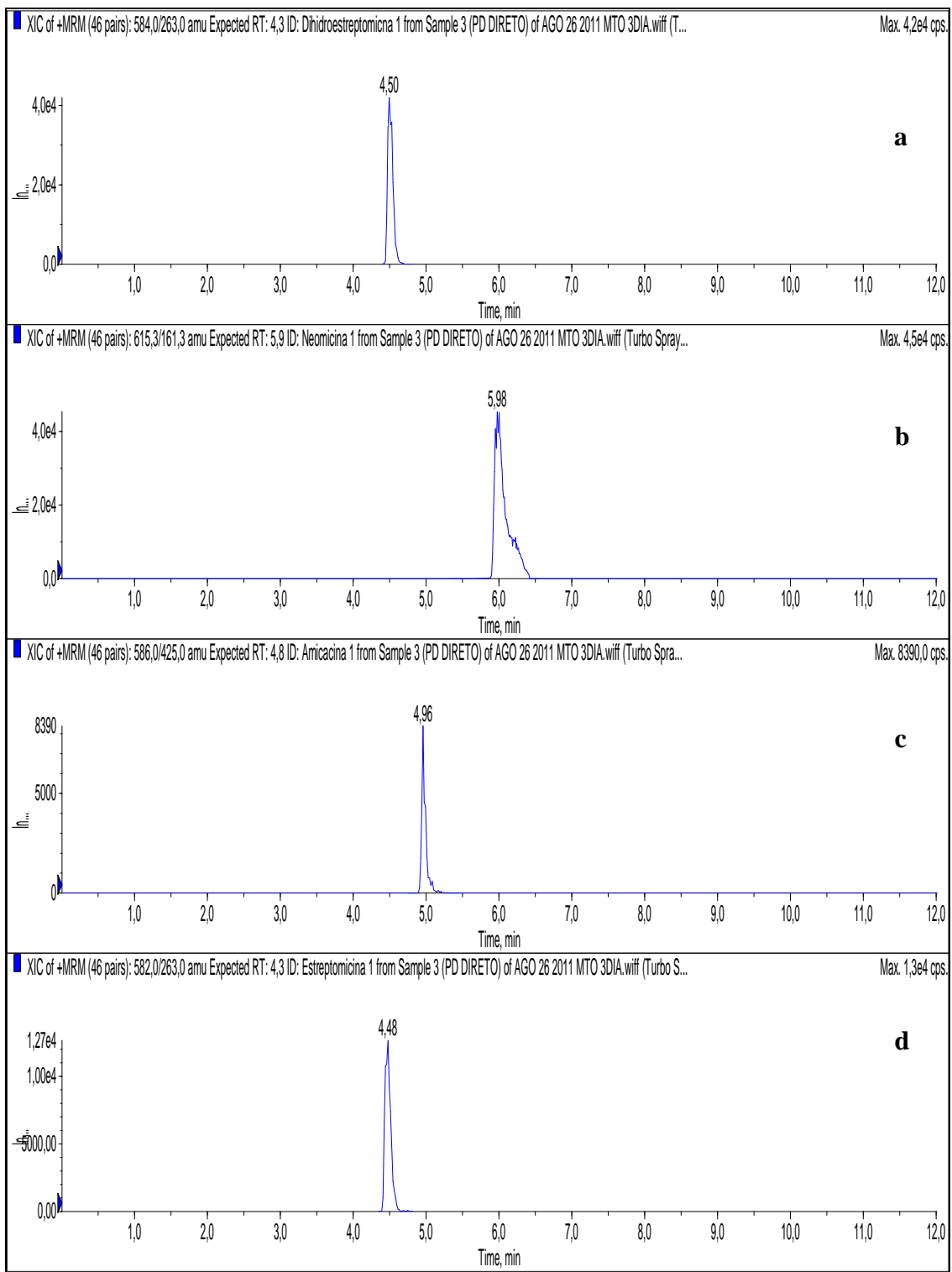


Figura 18 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos dihidroestreptomicina (a), neomicina (b), amicacina (c) e estreptomicina (d).

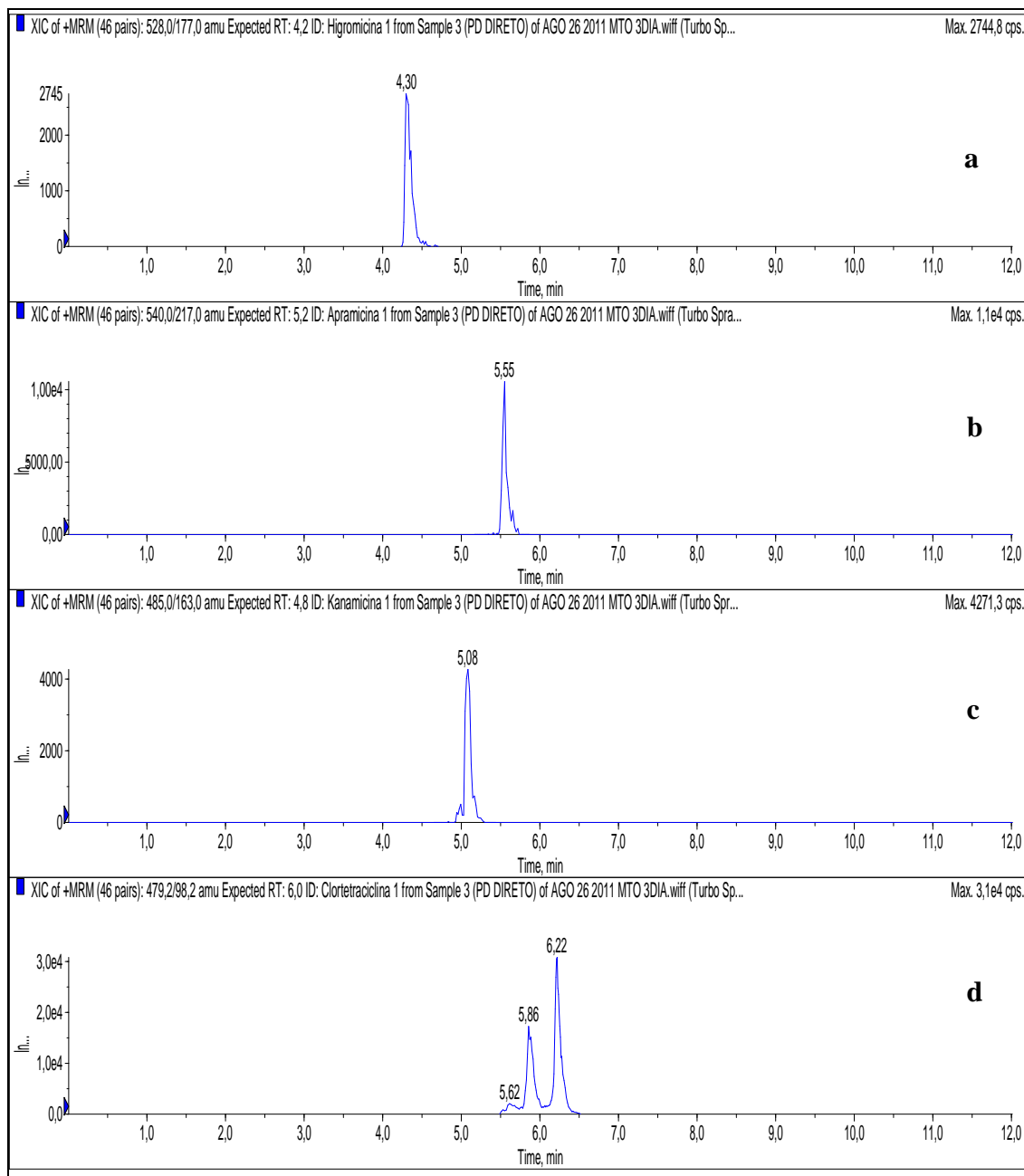


Figura 19 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos higromicina (a), apramicina (b), kanamicina (c) e clortetraciclina (d).

Os cromatogramas apresentados a seguir foram obtidos do Programa *Analyst*, versão 1.5.1 e ilustram todos os analitos extraídos pela acetonitrila e uma transição de cada analito estudado, os formatos dos picos e o

tempo de retenção nas condições de trabalho da validação. Os sinais apresentados são oriundos da injeção de uma solução de adição (*pool* dos analitos) na concentração alvo de triagem.

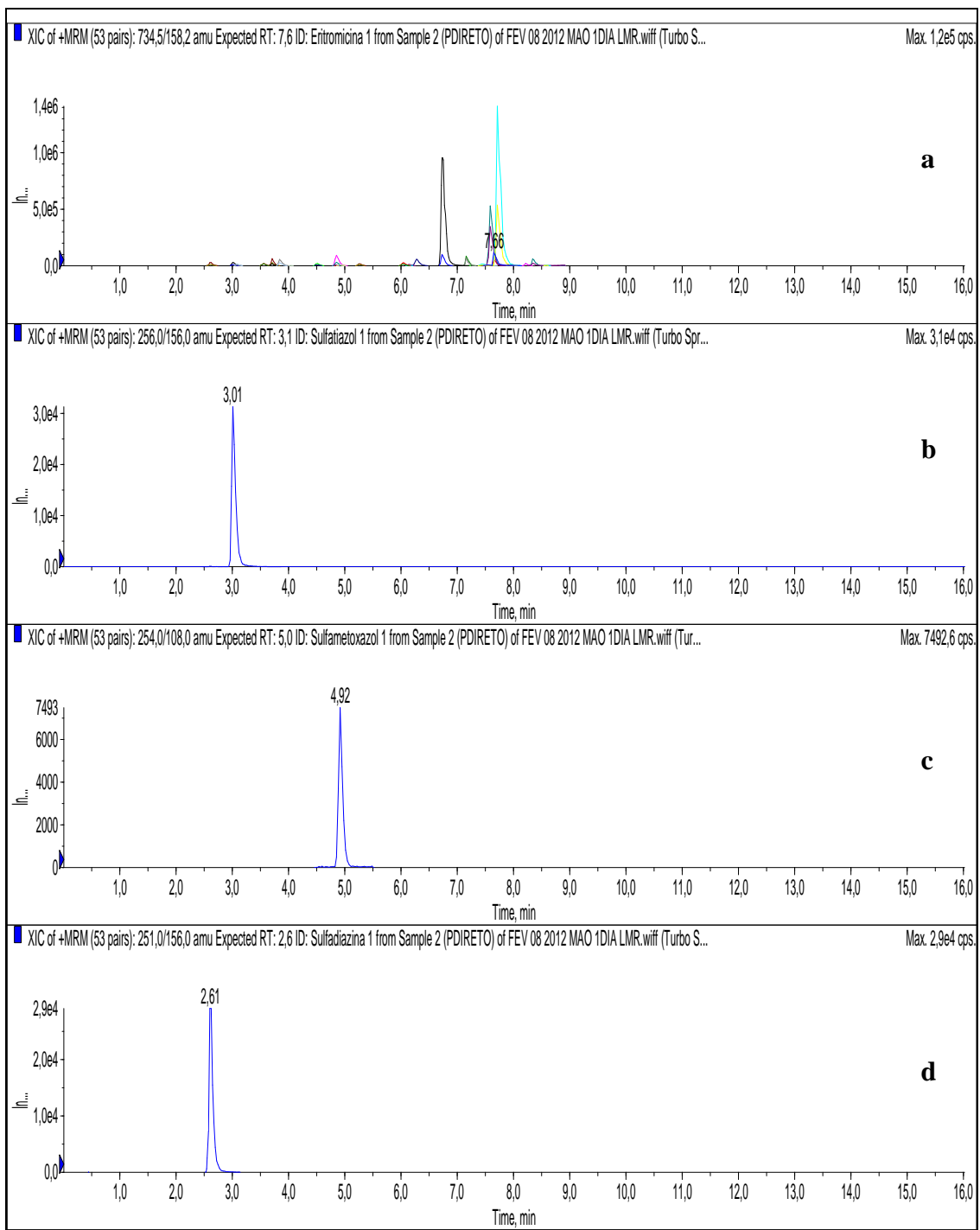


Figura 20 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, de todos os analitos extraídos pela acetoneitrila (a) e da primeira transição dos analitos sulfatiazol (b), sulfametoxazol (c), e sulfadiazina (d).

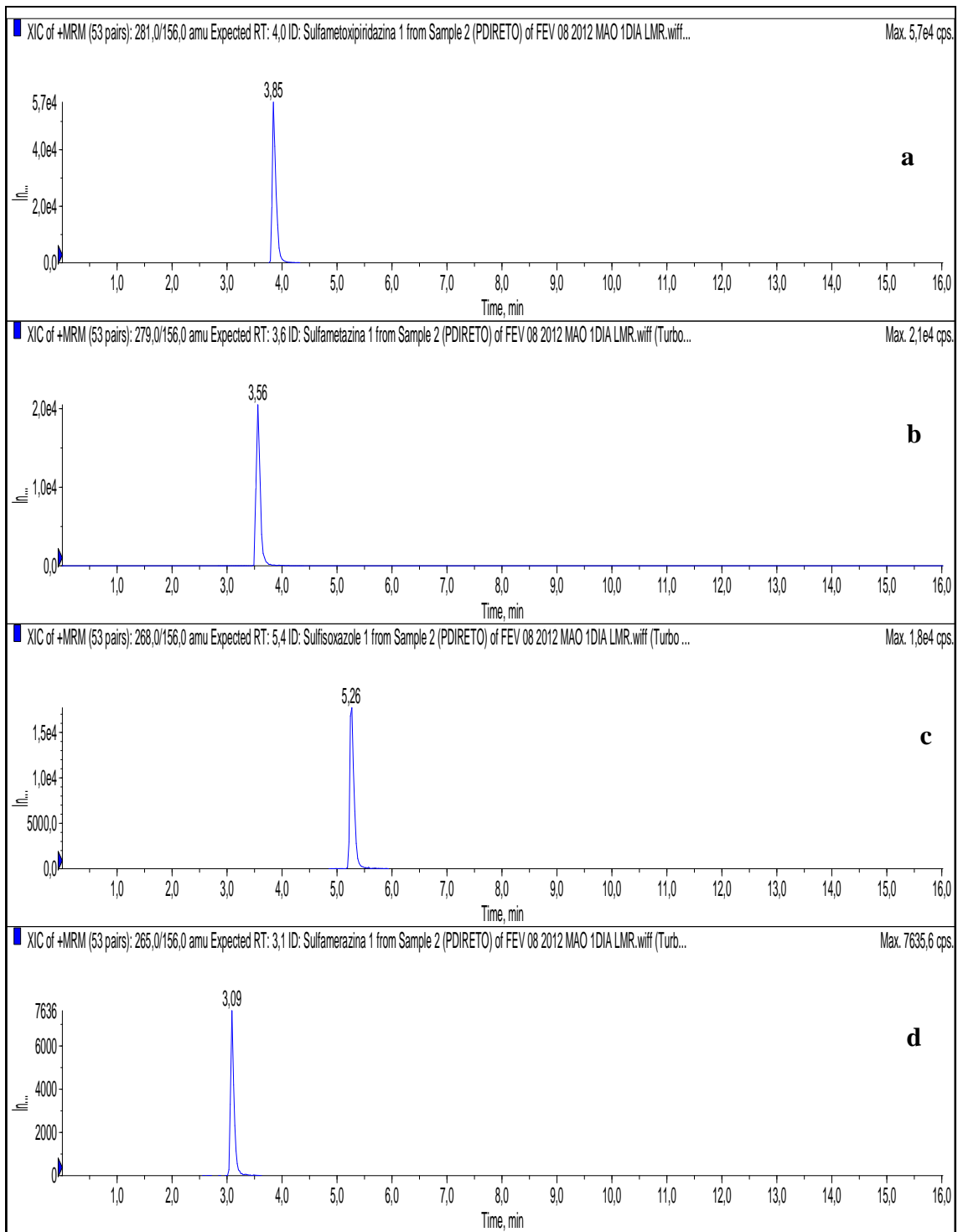


Figura 21 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos sulfametoxipiridazina (a), sulfametazina (b), sulfisoxazole (c) e sulfamerazina (d).

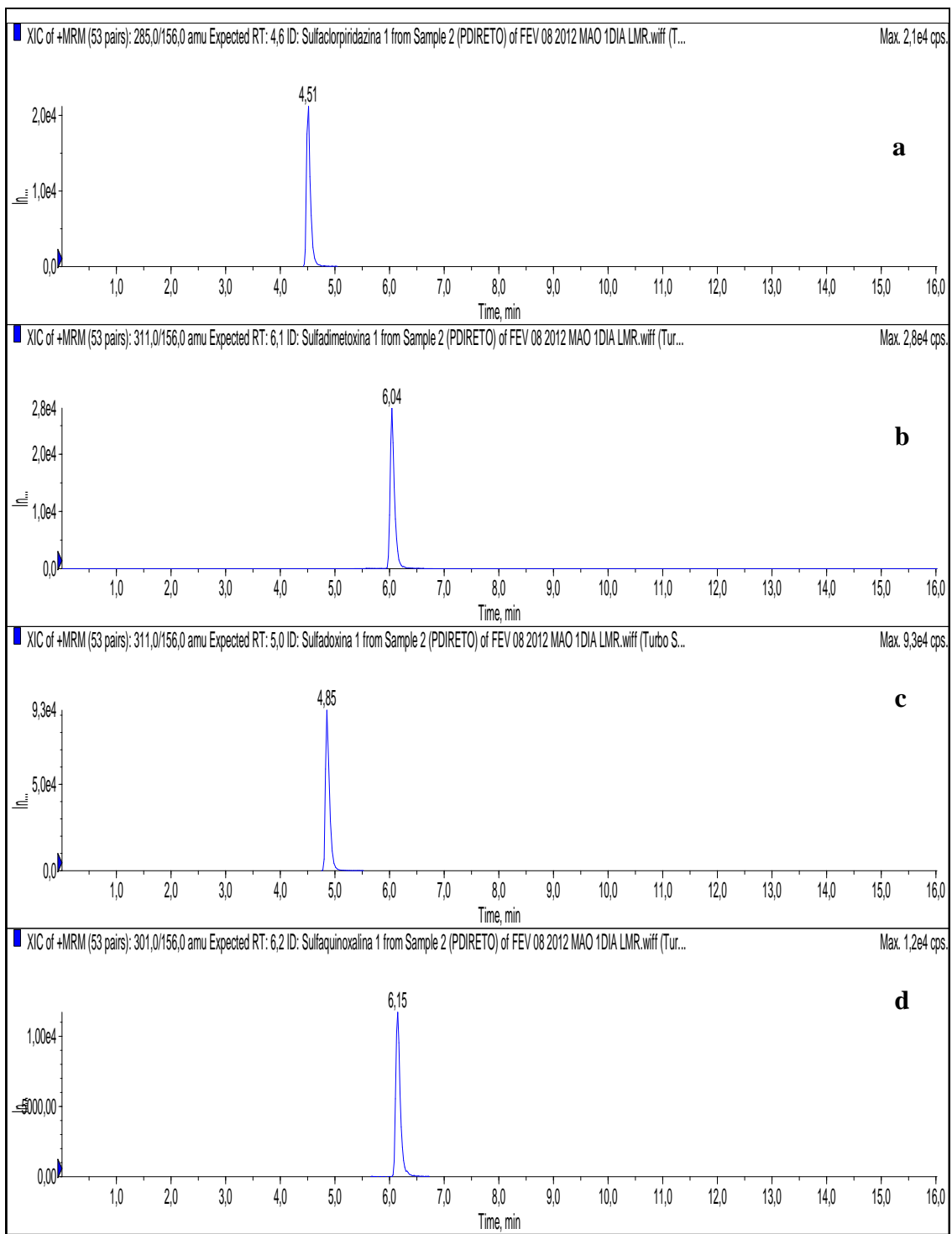


Figura 22 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos sulfaclopiridazina (a), sulfadimetoxina (b), sulfadoxina (c) e sulfaquinoxalina (d).

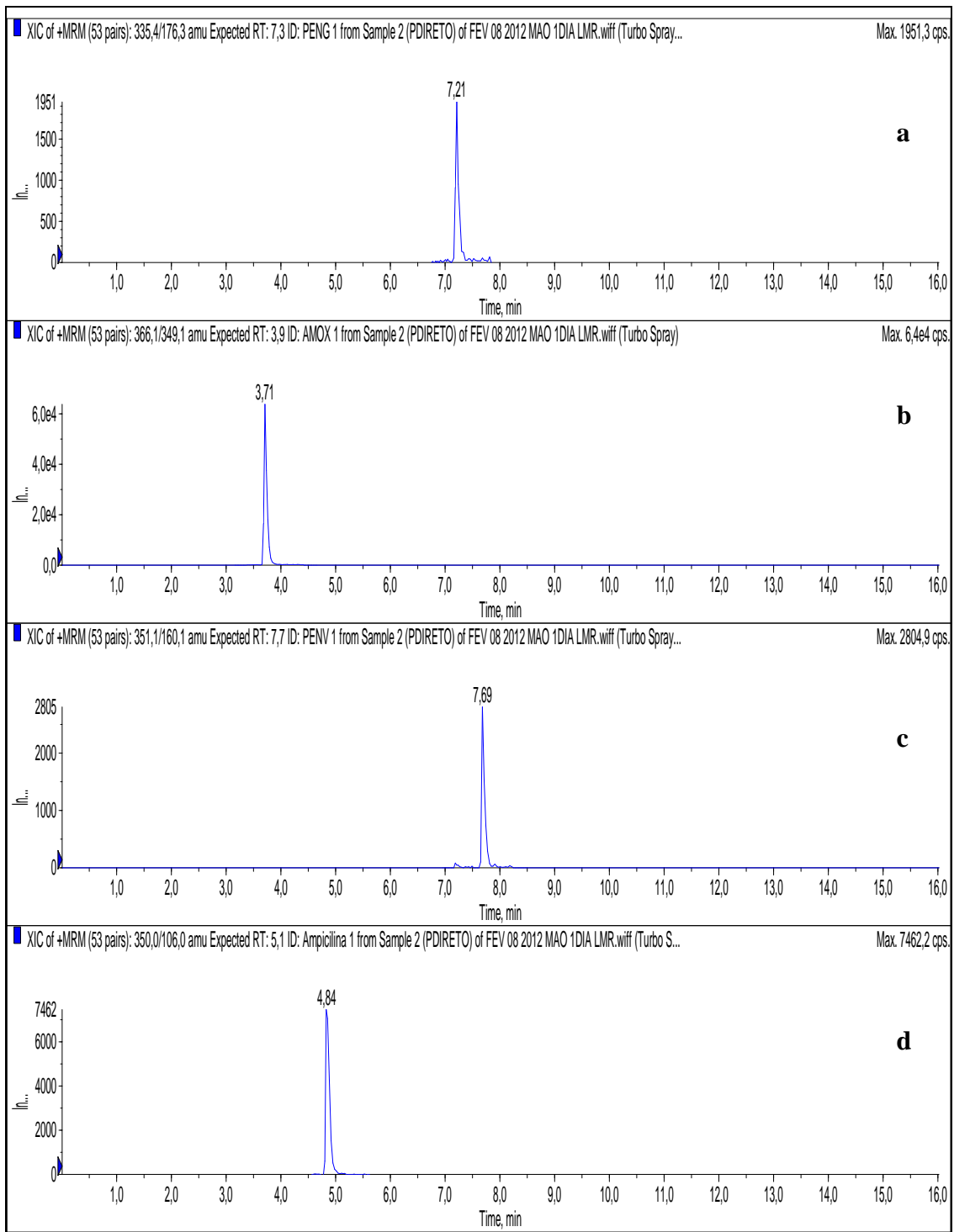


Figura 23 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos penicilina G (a), amoxicilina (b), penicilina V (c) e ampicilina (d).

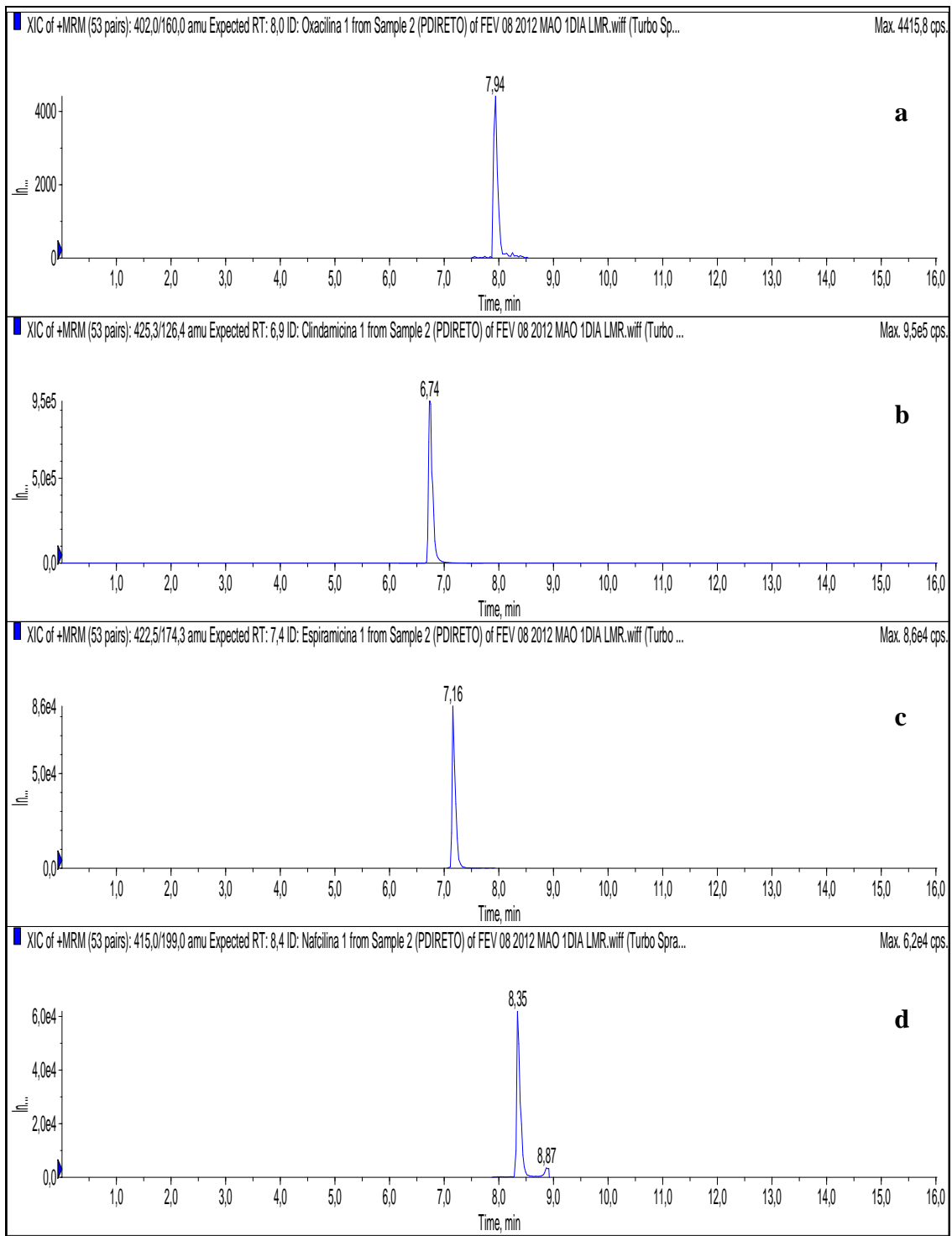


Figura 24 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos oxacilina (a), clindamicina (b), espiramicina (c) e nafcilina (d).

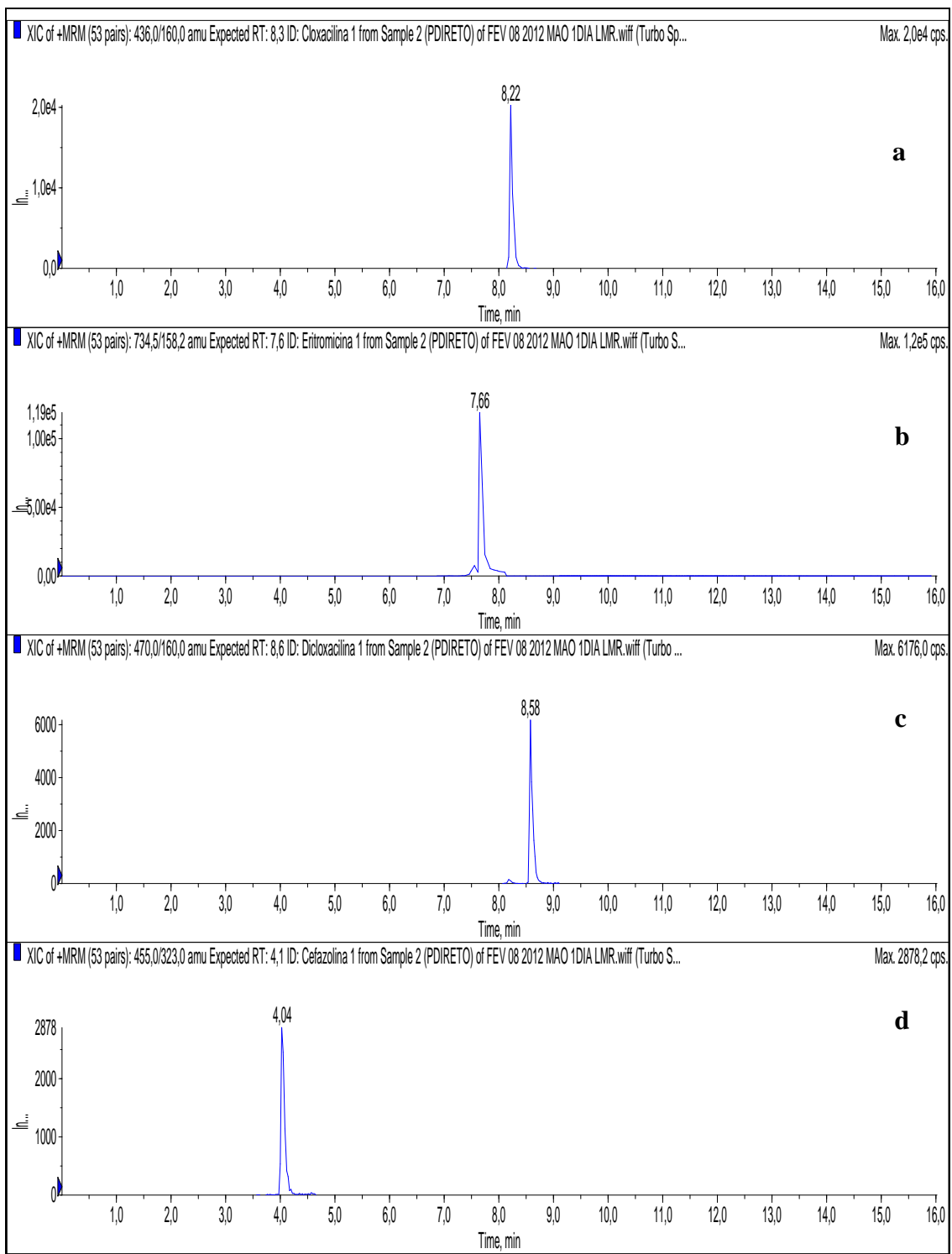


Figura 25 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos cloxacilina (a), eritromicina (b), dicloxacilina (c) e cefazolina (d).

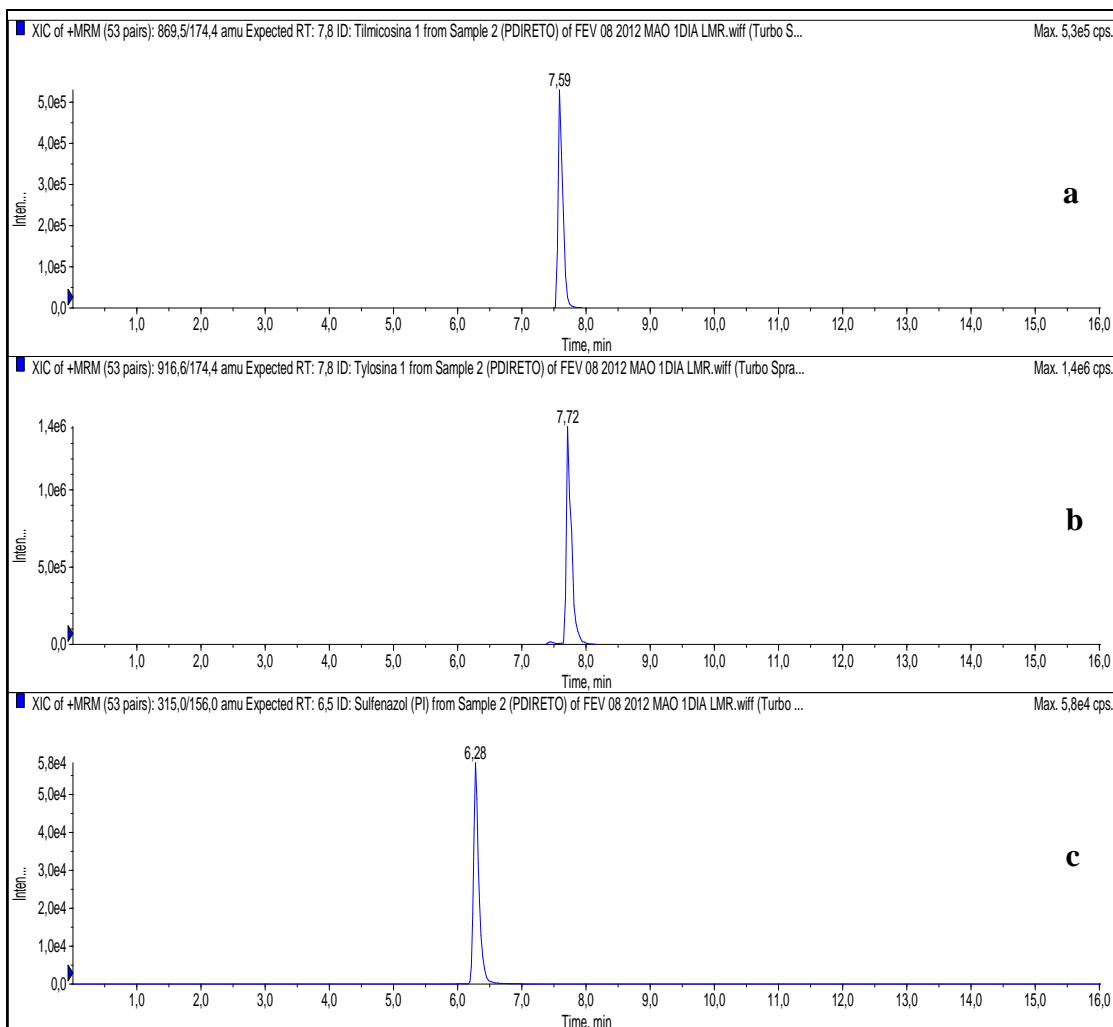


Figura 26 – Cromatogramas, nas condições de trabalho da validação, da primeira transição dos analitos tilmicosina (a), tylosina (b) e sulfafenazol (c).

Após o término dos testes de otimização os parâmetros determinados foram fixados e utilizados em todos os experimentos da validação.

4.2 Otimização dos Procedimentos de Extração

Preparo da amostra

Foram testadas 20 amostras brancas, oriundas de lotes diferentes, em cada procedimento de extração, valor que contempla as premissas da Decisão 2002/657/CE (European Commission,

2002), que estabelece análise de 20 ou mais amostras para verificação da especificidade do método. A especificidade foi analisada para cada analito (duas ou três transições), em seus respectivos tempos de retenção e a média dos resultados das respostas analíticas, vezes três, foi utilizada para o cálculo do limite de detecção do método, que será posteriormente apresentado. Os resultados das amostras extraídas pelo ácido tricloroacético provaram que o método foi capaz de detectar todos os analitos sem a ocorrência de supressão total ou realce no sinal dos mesmos pela matriz, com exceção para o analito flumequina. Nos cromatogramas gerados pelas amostras

brancas de matriz ovo extraídas pelo ácido tricloroacético foi possível identificar um pico com boa intensidade de sinal no tempo de retenção da flumequina (fig. 27).

Para as amostras brancas de matriz ovo extraídas pela acetonitrila os resultados apresentaram equivalência nula em relação aos analitos, ou seja, nenhum pico foi

detectado no tempo de retenção correspondente a cada analito o que pode ser observado na fig. 28. Os picos identificados pelo tempo de retenção se referem ao padrão interno (sulfafenazol). Logo, a matriz ovo não apresentou perfis capazes de interferir na detecção dos analitos demonstrando a alta especificidade do método em validação.

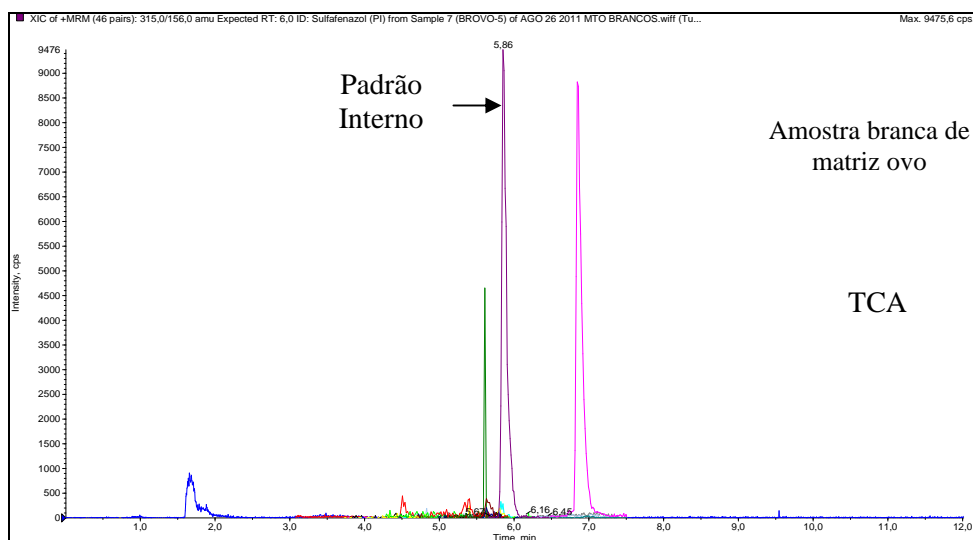


Figura 27 - Cromatograma gerado pela injeção de amostra branca de matriz ovo extraída por ácido tricloroacético (TCA) e fortificada com o padrão interno (sulfafenazol).
Nota: Cromatograma extraído do Programa *Analyst*, versão 1.5.1.

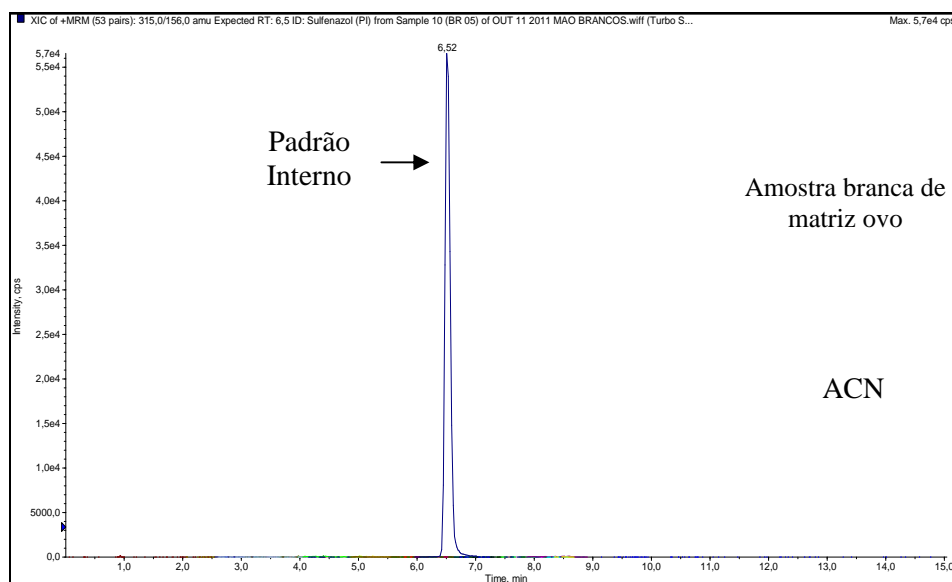


Figura 28 - Cromatograma gerado pela injeção de amostra branca de matriz ovo extraída por acetonitrila (ACN) e fortificada com o padrão interno (sulfafenazol).
Nota: Cromatograma extraído do Programa *Analyst*, versão 1.5.1.

O efeito de matriz é um parâmetro importante a ser estudado quando se utiliza métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas (Almeida, 2011). Segundo Paschoal et al. (2008), as diversas substâncias que compõem a matriz biológica podem causar supressão na ionização dos analitos de interesse, podendo reduzir consideravelmente a sensibilidade do método. Apesar da Decisão 2002/657/CE (European Commission, 2002) não mencionar este estudo, muitos autores recomendam o mesmo como complementação da validação. Segundo o FDA (2001) e Moreira (2012), o efeito de matriz deve ser investigado, pois coeluentes de matrizes complexas influenciam na ionização dos analitos e, conseqüentemente, na precisão e reprodutibilidade do método, principalmente quando são utilizados padrões externos. Para verificar o efeito de matriz quando se utiliza métodos quantitativos realiza-se a comparação das curvas de padrões em solvente e curva de

extrato de matriz branca adicionada de padrões, contudo, para métodos qualitativos, tais curvas não são realizadas.

Durante a análise dos resultados da injeção das amostras brancas (extração por ácido tricloroacético) observou-se a presença de um pico no tempo de retenção da flumequina. Tal pico interferiu no resultado analítico da primeira transição do analito. Na tentativa de avaliar a fonte do interferente os cromatogramas gerados pelas injeções de amostras de branco de reagente foram analisados e pode-se observar o mesmo sinal (fig. 29). Logo, a presença deste interferente, oriundo da solução de ácido tricloroacético a 5%, resultou no realce do sinal analítico da primeira transição da flumequina e, conseqüentemente, a validação para essa transição foi afetada. A tentativa de alterar o tempo de retenção para esse analito não foi eficaz. Para o branco de reagentes usado na extração por acetonitrila, nenhum interferente foi observado (fig. 30).

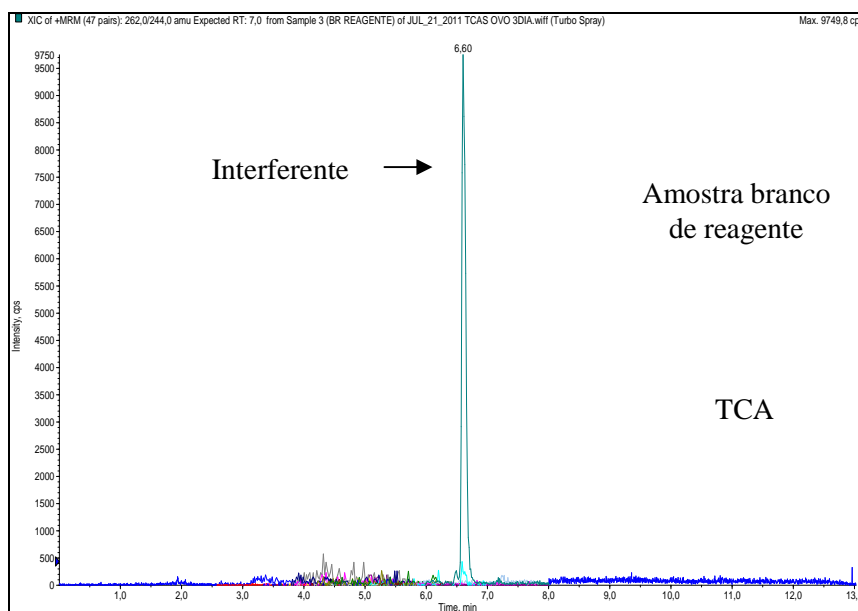


Figura 29 - Cromatograma gerado pela injeção de uma amostra de branco reagente – extração por ácido tricloroacético (TCA), sem a presença de matriz ovo e de padrão interno.

Nota: amostra branco de reagente contém apenas reagentes, solventes e água que são utilizados durante o procedimento de extração da amostra sem a presença de matriz e sem fortificação com analitos ou padrão interno.

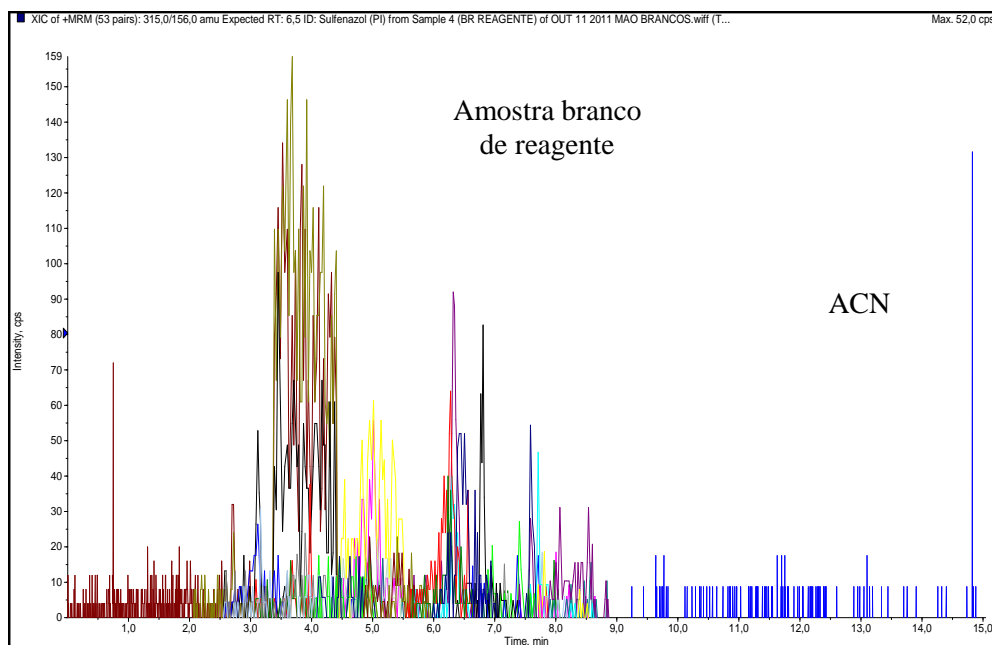


Figura 30 - Cromatograma gerado pela injeção de uma amostra de branco reagente – extração por acetonitrila (ACN), sem a presença de matriz ovo.

Nota: amostra branco de reagente contém apenas reagentes, solventes e água que são utilizados durante o procedimento de extração da amostra sem a presença de matriz e sem fortificação com analitos ou padrão interno.

Extração por TCA

Neste trabalho foram utilizadas duas rotas para o processo de extração. A maior dificuldade é adequar o solvente de extração aos analitos do grupo dos aminoglicosídeos, para os quais são usadas extrações ácidas. O uso do TCA a 5% foi capaz de extrair os analitos do grupo, mas a resposta analítica não se mostrou adequada na concentração de HFBA da fase móvel utilizada no método original (0,1%). Por isso, durante os procedimentos de otimização dos parâmetros instrumentais optou-se pelo uso de uma concentração maior de HFBA na fase móvel (0,2%), o que resultou em melhores respostas analíticas.

Para os procedimentos de extração foram testados diferentes procedimentos de centrifugação. Foi observado que o extrato final obtido pela extração por TCA apresentava turbidez e dificuldade de se filtrar por membrana de 0,22 μm quando

utilizada a centrifugação a 3000xg por 5 minutos. Com o objetivo de se obter um extrato mais límpido foi, após a homogeneização da amostra, extraída para tubos de microcentrifuga *Eppendorf* uma alíquota de 1,5 mL. Os tubos foram ultracentrifugados a 14462xg por 12 minutos. Para a realização do teste foram analisadas 20 amostras brancas fortificadas na concentração alvo de triagem. O resultado desse experimento indicou que o uso da ultracentrifugação proporcionou um extrato menos turvo e mais facilmente filtrado por membrana de 0,22 μm , quando comparado com extrato obtido pelo processo de centrifugação realizado a 3000xg.

4.3 Validação para Método Qualitativo

O procedimento de validação descrito já tem sido testado para métodos microbiológicos e seu uso pode ser considerado inédito na metodologia de cromatografia líquida

acoplada a espectrometria de massas sequencial (Gaugain-Juhel et al., 2009). O limite de detecção, a sensibilidade e o CC_{β} foram avaliados durante a validação e serão descritos a seguir para cada grupo de antibióticos.

Determinação do “Threshold Value” (T_{valor}) e Determinação do Fator de Corte (F_c)

O T_{valor} (resposta analítica mínima à partir da qual é possível detectar o analito) e o F_c (resposta analítica que indica que uma amostra contém uma substância com concentração igual ou superior ao nível de

interesse) foram calculados para cada analito e para as duas transições de cada analito. Foram utilizadas as áreas geradas por cada transição de cada analito para o cálculo dos parâmetros utilizados na validação (item 1.1.5).

Os resultados obtidos para as duas transições (identificação e confirmação) de cada analito a partir das injeções dos extratos das amostras fortificadas para a extração por ácido tricloroacético, nos dois níveis de concentração alvo de triagem, encontram-se nas tabelas abaixo (tabs. 16 e 17) e as interpretações dos resultados serão apresentadas por grupo de antimicrobianos.

Tabela 16 - Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por ácido tricloroacético validados em 0,75 da concentração alvo de triagem

Grupo	Analitos	Transição	T_{valor}	F_c	Avaliação de F_c e
					T_{valor}
Aminoglicosídeos	Espectinomicina	1 ^a	1.23E+02	6.05E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	4.63E+01	3.35E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Estreptomicina	1 ^a	3.81E+01	9.04E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	1.68E+01	5.57E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Dihidroestreptomicina	1 ^a	3.07E+02	4.62E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	1.03E+02	1.38E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Kanamicina	1 ^a	9.34E+02	7.26E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	1.38E+02	3.26E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Gentamicina	1 ^a	4.98E+03	2.08E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	5.09E+03	1.16E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Neomicina	1 ^a	5.50E+03	3.94E+03	$F_c < T_{\text{valor}}$
		2 ^a	1.58E+03	8.16E+02	$F_c < T_{\text{valor}}$
	Apramicina	1 ^a	9.52E+02	1.32E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	2.93E+03	1.16E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Higromicina	1 ^a	6.25E+01	7.58E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	2.46E+01	3.41E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Amicacina	1 ^a	1.48E+03	3.64E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	5.09E+02	8.73E+03	$F_c > T_{\text{valor}}$
Tobramicina	1 ^a	3.32E+03	1.42E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$	
	2 ^a	1.43E+04	9.49E+02	$F_c < T_{\text{valor}}$	
Lincomicina	1 ^a	2.25E+02	1.29E+05	$F_c > T_{\text{valor}}$	
	2 ^a	2.97E+01	1.00E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$	
Tetraciclina	Oxitetraciclina	1 ^a	1.58E+02	8.54E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	4.66E+01	4.08E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Clortetraciclina	1 ^a	1.50E+01	1.19E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	6.70E+00	1.05E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Tetraciclina	1 ^a	1.83E+02	2.64E+05	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	2.29E+02	7.03E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
	Doxiciclina	1 ^a	9.17E+01	9.94E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$
		2 ^a	1.02E+02	1.83E+04	$F_c > T_{\text{valor}}$

Cont. tabela 16

Quinolonas	Norfloxacin	1 ^a	1.91E+02	4.87E+03	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.98E+01	1.26E+03	Fc > T _{valor}
	Ciprofloxacina	1 ^a	3.28E+02	3.86E+03	Fc > T _{valor}
		2 ^a	3.21E+01	2.94E+03	Fc > T _{valor}
	Enrofloxacin	1 ^a	2.13E+02	3.16E+03	Fc > T _{valor}
		2 ^a	5.86E+01	7.80E+02	Fc > T _{valor}
	Sarafloxacin	1 ^a	1.27E+02	1.59E+03	Fc > T _{valor}
		2 ^a	2.08E+01	3.41E+01	Fc > T _{valor}
	Acido Oxolínico	1 ^a	3.96E+02	3.39E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.50E+02	5.80E+03	Fc > T _{valor}
	Acido Nalidíxico	1 ^a	1.72E+02	2.65E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.07E+02	2.51E+04	Fc > T _{valor}
	Flumequina	1 ^a	5.40E+04	4.22E+04	Fc < T_{valor}
		2 ^a	3.51E+01	9.44E+03	Fc > T _{valor}

Nota: F_c – Fator de Corte ou Cutt-off Factor; T_{valor} - Threshold Value

Tabela 17 - Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por ácido tricloroacético validados na concentração alvo de triagem

Grupo	Analitos	Transição	T _{valor}	F _c	Avaliação de F _c e T _{valor}
Aminoglicosídeos	Espectinomycin	1 ^a	1.72E+02	8.54E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	4.63E+01	5.48E+04	Fc > T _{valor}
	Estreptomycin	1 ^a	3.81E+01	4.75E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.68E+01	1.80E+04	Fc > T _{valor}
	Dihidroestreptomycin	1 ^a	3.07E+02	1.32E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.03E+02	4.61E+04	Fc > T _{valor}
	Kanamycin	1 ^a	9.34E+02	2.63E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.38E+02	1.11E+04	Fc > T _{valor}
	Gentamicin	1 ^a	5.09E+03	1.87E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	4.98E+03	1.56E+05	Fc > T _{valor}
	Neomicin	1 ^a	5.50E+03	9.14E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.58E+03	2.50E+04	Fc > T _{valor}
	Apramicin	1 ^a	9.46E+02	9.63E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	2.93E+03	8.07E+04	Fc > T _{valor}
	Higromycin	1 ^a	6.01E+01	3.76E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	7.14E+00	1.93E+04	Fc > T _{valor}
	Amicacin	1 ^a	1.48E+03	1.09E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	5.09E+02	3.48E+04	Fc > T _{valor}
Tobramycin	1 ^a	1.43E+04	4.47E+05	Fc > T _{valor}	
	2 ^a	3.34E+03	1.42E+05	Fc > T _{valor}	
Tetraciclínas	Lincomycin	1 ^a	2.28E+02	6.51E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	3.07E+01	5.39E+04	Fc > T _{valor}
	Oxitetraciclina	1 ^a	1.48E+02	2.62E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	6.42E+01	1.32E+05	Fc > T _{valor}
	Clortetraciclina	1 ^a	1.50E+01	4.35E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	6.70E+00	3.56E+04	Fc > T _{valor}
	Tetraciclina	1 ^a	2.03E+02	8.00E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	2.89E+02	1.89E+05	Fc > T _{valor}
	Doxiciclina	1 ^a	9.17E+01	3.05E+05	Fc > T _{valor}
		2 ^a	1.02E+02	5.90E+04	Fc > T _{valor}
Quinolonas	Norfloxacin	1 ^a	1.88E+02	1.36E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	4.53E+01	3.36E+03	Fc > T _{valor}
	Ciprofloxacina	1 ^a	3.28E+02	1.03E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	3.21E+01	8.24E+03	Fc > T _{valor}
	Enrofloxacin	1 ^a	2.01E+02	1.09E+04	Fc > T _{valor}
		2 ^a	7.25E+01	2.83E+03	Fc > T _{valor}

Cont. tabela 17

Quinolonas	Sarafloxacina	1 ^a	1.31E+02	1.66E+04	F _c > T _{valor}
		2 ^a	2.08E+01	836.78	F _c > T _{valor}
	Acido Oxolínico	1 ^a	1.08E+03	6.96E+04	F _c > T _{valor}
		2 ^a	1.51E+02	1.21E+04	F _c > T _{valor}
	Acido Nalidíxico	1 ^a	1.77E+02	5.05E+04	F _c > T _{valor}
		2 ^a	1.65E+02	4.93E+04	F _c > T _{valor}
	Flumequina	1 ^a	5.40E+04	1.44E+04	F _c < T _{valor}
		2 ^a	1.89E+02	1.74E+04	F _c > T _{valor}

Nota: F_c – Fator de Corte ou Cutt-off Factor; T_{valor} - Threshold Value

Aminoglicosídeos e Lincosamidas

Apenas a neomicina do grupo dos aminoglicosídeos e a lincomicina do grupo das lincosamidas apresentam LMR estabelecido de 500 µg.kg⁻¹ e 50 µg.kg⁻¹, respectivamente (Codex Alimentarius Commission, 2011; Comunidade Econômica Europeia, 2010). O nível de concentração alvo para a validação dos aminoglicosídeos foi de 375 e 500 µg.kg⁻¹, com exceção da kanamicina que foi validada na concentração de 37,5 e 50 µg.kg⁻¹. Já o procedimento de validação para a lincomicina foi realizado nos valores de 0,75 do LMR estabelecido (37,5 µg.kg⁻¹) e no valor do LMR (50 µg.kg⁻¹).

Os analitos que apresentaram resultados insatisfatórios, na validação realizada em 0,75 da concentração alvo de triagem (375 µg.kg⁻¹), foram a neomicina, pois os valores de F_c calculados são menores que os valores de T (F_c < T_{valor}) para as duas transições e a tobramicina que apresentou resultado insatisfatório para a segunda transição pesquisada. Neste caso, se for usada na rotina do método a concentração de 375 µg.kg⁻¹, para a neomicina não será confiável a identificação e confirmação, já para a tobramicina a transição que apresentou resultado dentro do esperado poderá ser usada como identificadora da presença ou não do analito, sem ser possível confirmar sua presença por esse método.

Tetraciclina

As tetraciclina foram validadas na concentração de 300 (0,75 da concentração alvo de triagem) e 400 µg.kg⁻¹ (Codex Alimentarius Commission, 2011) mesmo não sendo recomendado o uso de doxiciclina para poedeiras. As 60 amostras analisadas para cada nível de concentração validado apresentaram resultados satisfatórios para todos os analitos estando os valores de F_c acima do T_{valor} em todas elas. Estes resultados significam que o CC_β de todos os analitos estão abaixo dos níveis de concentração testados durante a validação.

Quinolonas

O uso de enrofloxacina e de flumequina não é indicado para poedeiras e os demais analitos do grupo não possuem limite estabelecido. A partir daí usou-se o valor de 10 µg.kg⁻¹ como concentração alvo de triagem, conforme disposto no item 1.1.4.

Para as quinolonas os resultados encontrados, quando se utilizou a concentração de 7,5 µg.kg⁻¹, foram satisfatórios para a maioria dos analitos pesquisados estando o CC_β abaixo do nível validado, exceto para a primeira transição da flumequina. Para as amostras fortificadas no valor do nível de interesse os resultados foram muito satisfatórios, pois o CC_β ficou abaixo do nível validado para todos os analitos, exceto para a primeira transição da flumequina que apresentou resultado insatisfatório novamente. Esse fato ocorreu por haver um interferente do TCA que

apresenta massa e tempo de retenção semelhantes ao da primeira transição da flumequina, como discutido anteriormente.

Na validação que foi realizada no valor do LMR ou do nível de concentração alvo dos analitos todos os resultados foram satisfatórios, com o CC_{β} abaixo dos valores utilizados neste experimento ($F_c > T_{valor}$).

Para o procedimento de extração realizado com acetonitrila, os resultados obtidos para as duas transições de cada analito encontram-se nas tabs. 18 e 19. Da mesma forma, a análise e interpretação dos resultados serão realizadas por grupo de antimicrobianos.

Tabela 18 - Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por acetonitrila validados em 0,75 da concentração alvo de triagem

Grupos	Analitos	Transição	T_{valor}	F_c	Avaliação de F_c e T_{valor}
Sulfonamidas	Sulfadiazina	1 ^a	1.29E+02	2.67E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	1.16E+02	1.03E+04	$F_c > T_{valor}$
	Sulfatiazol	1 ^a	3.72E+02	1.74E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	2.87E+02	5.83E+03	$F_c > T_{valor}$
	Sulfametazina	1 ^a	1.09E+02	3.74E+03	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	1.65E+02	2.67E+03	$F_c > T_{valor}$
	Sulfametoxipiridazina	1 ^a	1.86E+02	4.95E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	1.43E+02	2.01E+04	$F_c > T_{valor}$
	Sulfadoxina	1 ^a	1.09E+03	2.98E+05	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	2.07E+02	9.03E+04	$F_c > T_{valor}$
	Sulfaquinoxalina	1 ^a	5.54E+02	4.24E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	1.73E+02	1.44E+04	$F_c > T_{valor}$
	Sulfametoxazol	1 ^a	1.05E+03	2.47E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	3.16E+02	2.83E+04	$F_c > T_{valor}$
	Sulfaclorpiridazina	1 ^a	3.45E+01	1.67E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	3.93E+02	6.41E+03	$F_c > T_{valor}$
	Sulfisoxazole	1 ^a	1.25E+02	3.58E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	1.37E+02	2.16E+04	$F_c > T_{valor}$
	Sulfadimetoxina	1 ^a	1.09E+03	2.98E+05	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	2.07E+02	9.04E+04	$F_c > T_{valor}$
Sulfamerazina	1 ^a	9.46E+01	8.18E+03	$F_c > T_{valor}$	
	2 ^a	1.46E+02	1.66E+04	$F_c > T_{valor}$	
Macrolídeos e clindamicina	Eritromicina	1 ^a	1.60E+01	1.20E+05	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	7.17E+00	6.12E+04	$F_c > T_{valor}$
	Espiramicina	1 ^a	1.30E+02	8.85E+04	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	5.59E+01	5.81E+04	$F_c > T_{valor}$
	Tilmicosina	1 ^a	0.00E+00	4.58E+05	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	0.00E+00	2.71E+05	$F_c > T_{valor}$
	Tilosina	1 ^a	1.12E+01	1.39E+06	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	1.73E+01	4.79E+05	$F_c > T_{valor}$
	Clindamicina	1 ^a	5.40E+01	2.49E+06	$F_c > T_{valor}$
		2 ^a	2.01E+01	2.18E+05	$F_c > T_{valor}$

Cont. tabela 18

Beta-lactâmicos	Penicilina V	1ª	2.07E+01	1.61E+03	Fc > T _{valor}
		2ª	3.52E+01	5.69E+01	Fc > T _{valor}
	Penicilina G	1ª	3.94E+01	2.10E+03	Fc > T _{valor}
		2ª	3.79E+01	1.97E+03	Fc > T _{valor}
	Amoxicilina	1ª	5.21E+02	-1.24E+04	Fc < T_{valor}
		2ª	1.10E+03	-2.78E+03	Fc < T_{valor}
	Ampicilina	1ª	2.34E+01	-9.58E+02	Fc < T_{valor}
		2ª	1.52E+01	1.03E+03	Fc > T _{valor}
	Oxacilina	1ª	6.42E+00	3.27E+03	Fc > T _{valor}
		2ª	5.89E+01	3.23E+03	Fc > T _{valor}
	Cloxacilina	1ª	3.57E+01	3.85E+03	Fc > T _{valor}
		2ª	6.04E+01	4.40E+03	Fc > T _{valor}
	NaFcilina	1ª	1.94E+02	3.27E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	2.73E+03	1.04E+04	Fc > T _{valor}
	Dicloxacilina	1ª	3.09E+01	7.47E+02	Fc > T _{valor}
		2ª	3.48E+02	4.50E+02	Fc > T _{valor}
Cefazolina	1ª	7.69E+00	4.48E+03	Fc > T _{valor}	
	2ª	1.03E+02	2.34E+03	Fc > T _{valor}	

Nota: F_c – Fator de Corte ou Cutt-off Factor; T_{valor} - Threshold Value

Tabela 19 - Valores de T_{valor} e F_c para os analitos extraídos por acetonitrila validados na concentração alvo de triagem

Grupos	Analitos	Transição	T _{valor}	F _c	Avaliação de F _c e
					T _{valor}
Sulfonamidas	Sulfadiazina	1ª	1.29E+02	2.83E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	1.16E+02	1.24E+04	Fc > T _{valor}
	Sulfatiazol	1ª	3.72E+02	4.14E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	2.87E+02	1.58E+04	Fc > T _{valor}
	Sulfametazina	1ª	1.09E+02	3.54E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	1.65E+02	3.04E+04	Fc > T _{valor}
	Sulfametoxipiridazina	1ª	1.86E+02	5.43E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	1.43E+02	2.60E+04	Fc > T _{valor}
	Sulfadoxina	1ª	1.09E+03	3.01E+05	Fc > T _{valor}
		2ª	2.07E+02	1.02E+05	Fc > T _{valor}
	Sulfaquinoxalina	1ª	5.54E+02	6.25E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	1.73E+02	2.42E+04	Fc > T _{valor}
	Sulfametoxazol	1ª	1.05E+03	3.01E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	3.16E+02	3.32E+04	Fc > T _{valor}
	Sulfaclorpiridazina	1ª	3.45E+01	9.27E+03	Fc > T _{valor}
		2ª	3.93E+02	3.86E+03	Fc > T _{valor}
	Sulfisoxazole	1ª	1.25E+02	5.18E+04	Fc > T _{valor}
		2ª	1.37E+02	3.38E+04	Fc > T _{valor}
Sulfadimetoxina	1ª	1.09E+03	3.01E+05	Fc > T _{valor}	
	2ª	2.07E+02	1.02E+05	Fc > T _{valor}	
Sulfamerazina	1ª	9.46E+01	1.50E+04	Fc > T _{valor}	
	2ª	1.46E+02	3.60E+04	Fc > T _{valor}	

Cont. tabela 19

Macrolídeos e clindamicina	Eritromicina	1ª	1.60E+01	1.11E+05	F _c > T _{valor}
		2ª	7.17E+00	4.71E+04	F _c > T _{valor}
	Espiramicina	1ª	1.30E+02	1.69E+05	F _c > T _{valor}
		2ª	5.59E+01	1.15E+05	F _c > T _{valor}
	Tilmicosina	1ª	0.00E+00	8.41E+04	F _c > T _{valor}
		2ª	0.00E+00	5.06E+04	F _c > T _{valor}
	Tilosina	1ª	1.12E+01	1.59E+06	F _c > T _{valor}
		2ª	1.73E+01	6.48E+05	F _c > T _{valor}
	Clindamicina	1ª	5.40E+01	2.27E+06	F _c > T _{valor}
		2ª	2.01E+01	2.13E+05	F _c > T _{valor}
Beta-lactâmicos	Penicilina V	1ª	2.07E+01	3.69E+03	F _c > T _{valor}
		2ª	3.52E+01	3.02E+02	F _c > T _{valor}
	Penicilina G	1ª	3.94E+01	5.52E+03	F _c > T _{valor}
		2ª	3.79E+01	5.57E+03	F _c > T _{valor}
	Amoxicilina	1ª	5.21E+02	1.47E+03	F _c > T _{valor}
		2ª	1.10E+03	-5.22E+02	F_c < T_{valor}
	Ampicilina	1ª	2.34E+01	1.59E+03	F _c > T _{valor}
		2ª	1.52E+01	656.50	F _c > T _{valor}
	Oxacilina	1ª	6.42E+00	4.75E+03	F _c > T _{valor}
		2ª	5.89E+01	4.77E+03	F _c > T _{valor}
	Cloxacilina	1ª	3.57E+01	1.64E+04	F _c > T _{valor}
		2ª	6.04E+01	1.92E+04	F _c > T _{valor}
	NaFcilina	1ª	1.94E+02	5.19E+04	F _c > T _{valor}
		2ª	2.73E+03	1.59E+04	F _c > T _{valor}
	Dicloxacilina	1ª	3.09E+01	5.86E+03	F _c > T _{valor}
		2ª	3.48E+02	3.57E+03	F _c > T _{valor}
Cefazolina	1ª	7.69E+00	-3.60E+02	F_c < T_{valor}	
	2ª	1.03E+02	-2.67E+02	F_c < T_{valor}	

Nota: F_c – Fator de Corte ou Cutt-off Factor; T_{valor} - Threshold Value

Sulfonamidas e Macrolídeos

Os resultados obtidos para a extração com ACN foram satisfatórios, nas amostras fortificadas em 0,75 do LMR ou no nível de interesse (7,5 e 10 µg.kg⁻¹, respectivamente) para todos os analitos do grupo das sulfonamidas e dos macrolídeos. Desta forma, o CC_β estimado ficou abaixo dos níveis utilizados, pois todos os F_c foram maiores que o T_{valor}.

Beta-lactâmicos e Cefazolina

De todos os analitos pesquisados, com exceção da amoxicilina (para as duas transições) e da ampicilina (primeira transição), pois os valores de F_c são menores que o T_{valor}, o nível de concentração de 37,5 µg.kg⁻¹ foi validado com sucesso. Na avaliação das 60 amostras fortificadas no

nível de interesse (50 µg.kg⁻¹) apenas a segunda transição da amoxicilina apresentou resultado insatisfatório, com o valor de F_c menor que o valor de T encontrado.

A análise dos resultados das amostras fortificadas no nível de interesse (50 µg.kg⁻¹) para a cefazolina demonstrou uma redução significativa dos sinais do analito o que resultou em um valor de F_c inferior ao T_{valor}. Contudo, no procedimento realizado em 0,75 desse valor os resultados encontrados foram satisfatórios, permitindo, assim, o seu uso na rotina de análises do laboratório. Cabe ressaltar que novas pesquisas com valores de concentração superiores às testadas deverão ser executadas pelos técnicos do laboratório nas análises de rotina com o objetivo de verificar o perfil das respostas analíticas para a cefazolina.

Limite de Detecção (LD) e Sensibilidade

Os limites de detecção e a sensibilidade para todos os analitos extraídos pelo ácido tricloroacético a 5% (TCA) na validação executada no nível de 0,75 da concentração alvo de triagem e no nível da concentração

alvo de triagem (item 1.1.4) serão apresentados nas tabelas seguintes e discutidos posteriormente. Os valores obtidos para cada parâmetro foram calculados com base nas equações apresentadas no item 1.1.5 (Gaugain-Juhel et al., 2010).

Tabela 20 - Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo dos aminoglicosídeos e da lincomicina validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem

1ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Espectinomicina	<1	100	<1	95
Estreptomomicina	<1	100	<1	100
Dihidroestreptomomicina	<1	100	<1	100
Kanamomicina	1,56	100	<1	100
Gentamicina	23,38	100	4,68	100
Neomicina	38,03	100	6,22	100
Apramicina	31,43	100	7,60	100
Higromomicina	<1	100	<1	100
Amicacina	8,04	100	3,71	100
Tobramomicina	27,82	100	5,18	100
Lincomomicina	<1	100	<1	100

2ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Espectinomicina	<1	100	<1	100
Estreptomomicina	<1	100	<1	100
Dihidroestreptomomicina	<1	100	<1	95
Kanamomicina	1,12	100	4,87	100
Gentamicina	17,90	100	5,44	100
Neomicina	46,69	100	6,91	100
Apramicina	22,60	100	5,22	95
Higromomicina	1,46	100	<1	100
Amicacina	6,09	100	3,29	100
Tobramomicina	1676,55	100	7,01	100
Lincomomicina	<1	100	<1	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (μm) $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram apresentados pelo símbolo (<) seguido de 1.

Os limites de detecção para os aminoglicosídeos foram calculados e variaram de 0,04 a 38,03 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (neomicina) para a primeira transição e de 0,04 a 1676,55 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (tobramomicina) para a

segunda transição na validação em 0,75 da concentração alvo de triagem. Para a validação realizada na concentração alvo de triagem os limites de detecção variaram de 0,01 a 7,60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (apramicina) e de 0,13 a

7,01 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (tobramicina). A sensibilidade do método variou de 95% a 100% para todos os analitos do grupo estando, dessa forma, dentro do esperado, que deve ser igual ou

superior a 95% para que o CC_B esteja abaixo do nível de concentração testado e, com isso, o número de falso-negativo seja inferior a 5% (Gaugain-Juhel et al., 2009).

Tabela 21 - Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo das tetraciclinas validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem

1ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Oxitetraciclina	<1	100	<1	100
Tetraciclina	<1	100	<1	100
Clortetraciclina	<1	100	<1	100
Doxiciclina	<1	100	<1	100
2ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Oxitetraciclina	<1	100	<1	100
Tetraciclina	1,08	100	<1	100
Clortetraciclina	<1	100	<1	100
Doxiciclina	7,36	100	<1	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (μm) $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram apresentados pelo símbolo (<) seguido de 1.

Para os analitos do grupo das tetraciclinas os limites de detecção para a primeira transição variaram de 0,13 a 0,38 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ na validação que usou o valor de 0,75 da concentração alvo e de 0,06 a 0,15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ quando se usou o valor da concentração alvo Para a segunda transição os valores variaram de 0,10 a 7,36

$\mu\text{g.kg}^{-1}$ e de 0,05 a 0,56 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente.

A sensibilidade foi calculada para todos os analitos nos dois níveis de validação e todos os resultados encontrados estão em de acordo com o esperado ($\geq 95\%$).

Tabela 22 - Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo das quinolonas validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem

1ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Norfloxacina	<1	100	<1	100
Ciprofloxacina	<1	100	<1	100
Enrofloxacina	<1	100	<1	100
Sarafloxacina	<1	100	<1	100
Ácido oxolínico	<1	100	<1	100
Ácido Nalidíxico	<1	100	<1	100
Flumequina	7,88	100	<1	100

Cont. tabela 22

2ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD (µg.kg ⁻¹)	Sensibilidade (%)	LD (µg.kg ⁻¹)	Sensibilidade (%)
Norfloxacina	<1	100	<1	100
Ciprofloxacina	<1	100	<1	100
Enrofloxacina	<1	100	<1	100
Sarafloxacina	<1	100	<1	100
Ácido oxolínico	<1	100	<1	100
Ácido Nalidíxico	<1	100	<1	100
Flumequina	20,48	100	<1	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (um) µg.kg⁻¹ foram apresentados pelo símbolo (<) seguido de 1.

O limite de detecção para as quinolonas foi calculado para os dois níveis de validação (0,75 e concentração alvo de triagem) e variou, para a primeira transição de 0,06 a 7,88 µg.kg⁻¹ (flumequina) e de 0,04 a 20,48 µg.kg⁻¹ (flumequina), respectivamente. E para a segunda transição os valores ficaram entre 0,04 a 0,44 µg.kg⁻¹ e entre 0,03 a 0,15 µg.kg⁻¹. Para todos os analitos do grupo, independente da concentração alvo de

triagem usada, a sensibilidade encontrada foi de 100%.

Para os analitos extraídos pelo ACN os limites de detecção e a sensibilidade para cada transição nos dois níveis de concentração alvo de triagem (0,75 da concentração e na concentração alvo) serão apresentados a seguir.

Tabela 23 - Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo das sulfonamidas validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem

1ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD (µg.kg ⁻¹)	Sensibilidade (%)	LD (µg.kg ⁻¹)	Sensibilidade (%)
Sulfadiazina	<1	100	<1	100
Sulfatiazol	<1	100	<1	100
Sulfametazina	<1	100	<1	100
Sulfametoxipiridazina	<1	100	<1	100
Sulfadoxina	<1	100	<1	100
Sulfaquinoxalina	<1	100	<1	100
Sulfametoxazol	<1	95	<1	100
Sulfaclorpiridazina	<1	100	<1	100
Sulfisoxazole	<1	100	<1	100
Sulfadimetoxina	<1	100	<1	100
Sulfamerazina	<1	100	<1	100

2ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD (µg.kg ⁻¹)	Sensibilidade (%)	LD (µg.kg ⁻¹)	Sensibilidade (%)
Sulfadiazina	<1	100	<1	100
Sulfatiazol	<1	90	<1	100
Sulfametazina	<1	100	<1	100

Cont. tabela 23				
Sulfametoxipiridazina	<1	100	<1	100
Sulfadoxina	<1	100	<1	100
Sulfaquinoxalina	<1	100	<1	100
Sulfametoxazol	<1	100	<1	100
Sulfaclorpiridazina	<1	100	<1	100
Sulfisoxazole	<1	100	<1	100
Sulfadimetoxina	<1	100	<1	100
Sulfamerazina	<1	100	<1	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (um) $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram apresentados pelo símbolo (<) seguido de 1.

Os limites de detecção calculados em ambos os procedimentos de validação foram inferiores a 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para todas as sulfonamidas e a sensibilidade do método para as duas transições nos dois níveis de validação estão de acordo com o valor esperado que deve ser superior a 95% (Gaugain-Juhel et al., 2009), com exceção da sensibilidade encontrada para a 2ª

transição do sulfatiazol em 0,75 da concentração alvo de triagem ou 7,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ que apresentou resultado igual a 90% abaixo do valor esperado. Contudo, uma única transição com sensibilidade $\geq 95\%$ pode garantir uma capacidade de detecção suficiente para o analito e direcionar a amostra para a confirmação.

Tabela 24 - Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo dos macrolídeos e para a clindamicina validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem

1ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Eritromicina	<1	100	<1	100
Espiramicina	<1	100	<1	100
Tilmicosina	<1	100	<1	100
Tilosina	<1	100	<1	100
Clindamicina	<1	100	<1	100
2ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Eritromicina	<1	100	<1	100
Espiramicina	<1	100	<1	100
Tilmicosina	<1	100	<1	100
Tilosina	<1	100	<1	100
Clindamicina	<1	100	<1	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (um) $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram apresentados pelo símbolo (<) seguido de 1.

Os resultados encontrados para todos os analitos do grupo dos macrolídeos e para a clindamicina apresentaram limites de detecção inferiores a 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Com relação à sensibilidade todos os analitos apresentaram resultados acima do valor esperado (95%) para ambas as transições.

Tabela 25 - Limite de detecção e sensibilidade das duas transições dos analitos do grupo dos beta-lactâmicos validados nos dois níveis de concentração alvo de triagem

1ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Penicilina V	<1	100	<1	100
Penicilina G	<1	100	<1	100
Amoxicilina	1,15	-	2,55	100
Ampicilina	<1	-	<1	100
Oxacilina	<1	100	<1	100
Cloxacilina	<1	100	<1	100
Nafcilina	<1	100	<1	100
Dicloxacilina	<1	100	<1	100
Cefazolina	<1	100	<1	100
2ª Transição				
Analito	0,75 x Concentração Alvo		1 x Concentração Alvo	
	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensibilidade (%)
Penicilina V	<1	100	1,76	100
Penicilina G	<1	100	<1	100
Amoxicilina	3,17	-	12,05	-
Ampicilina	<1	100	<1	100
Oxacilina	<1	100	<1	100
Cloxacilina	<1	100	<1	100
Nafcilina	1,59	100	2,35	100
Dicloxacilina	1,34	100	2,10	100
Cefazolina	<1	100	2,98	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (μm) $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram apresentados pelo símbolo (<) seguido de 1.

Para os analitos do grupo dos beta-lactâmicos a validação realizada em 0,75 da concentração alvo de triagem não apresentou resultados satisfatórios para a amoxicilina e a ampicilina. Devido ao valor negativo de F_c encontrado para esses analitos o teste de sensibilidade do método não foi realizado, com exceção da 2ª transição da ampicilina que apresentou resultado satisfatório para a sensibilidade e, com isso, pode ser usada para a triagem do analito se for usada na rotina das análises o valor de $37,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a triagem.

O teste de sensibilidade do método não foi realizado para a segunda transição da amoxicilina quando foi utilizada a

concentração de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pelo mesmo motivo exposto anteriormente. Para os demais analitos e para a primeira transição da amoxicilina, os resultados de sensibilidade encontrados foram satisfatórios.

A compilação dos resultados de todos os analitos validados nos valores de concentração alvo de triagem está disposta na tab. 26.

Tabela 26 - Resultados encontrados para os analitos na validação realizada na concentração alvo de triagem

Analito	1ª Transição				2ª Transição			
	$F_c/T_{valor}/B$	CC_{β}	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensib (%)	$F_c/T_{valor}/B$	CC_{β}	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensib (%)
Espectinomicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	95	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Estreptomicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Dihidroestreptomicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	95
Kanamicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	4,87	100
Gentamicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	4,68	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	5,44	100
Neomicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	6,22	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	6,91	100
Apramicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	7,60	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	5,22	95
Higromicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Amicacina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	3,71	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	3,29	100
Tobramicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	5,18	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	7,01	100
Lincomicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Oxitetraciclina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Clortetraciclina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Tetraciclina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Doxiciclina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Norfloxacin	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Ciprofloxacina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Enrofloxacin	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sarafloxacin	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Acido Oxolínico	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Acido Nalidíxico	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Flumequina	$F_c < B$	>Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfadiazina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfatiazol	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfametazina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfametoxipiridazina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfadoxina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfaquinoxalina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfametoxazol	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfaclopiridazina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfisoxazole	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfadimetoxina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Sulfamerazina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Eritromicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Espiramicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Tilmicosina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Tilosina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Clindamicina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Penicilina V	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	1,76	100
Penicilina G	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Amoxicilina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	2,55	100	$F_c < B$	>Cval	12,05	100
Ampicilina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Oxacilina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Cloxacilina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100
Nafcilina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	2,35	100
Dicloxacilina	$F_c > T_{valor}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{valor}$	<Cval	2,10	100
Cefazolina	$F_c < B$	>Cval	<1	100	$F_c < B$	>Cval	2,98	100

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (um) $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram apresentados pelo símbolo (<) seguindo de 1.

Cval – Concentração alvo de triagem usada na validação.

B – três vezes o valor da área apresentada no tempo de retenção de cada analito (duas transições) nas amostras brancas de matriz ovo.

Sensib. – Sensibilidade

F_c – Fator de Corte ou Cutt-off Factor; T_{valor} - Threshold Value

Os resultados da validação, que foi desenvolvida no valor de concentração alvo de triagem, demonstraram claramente que o método é aceitável para a identificação e confirmação de todos os analitos testados, com algumas ressalvas que foram discutidas ao longo da apresentação dos resultados.

Particularmente, os seguintes analitos devem ser levados em consideração: flumequina (primeira transição com Fator de Corte menor que a média das respostas analíticas das amostras brancas), amoxicilina (Fator de Corte com valor inferior ao valor da média das respostas analíticas das amostras brancas para a segunda transição e teste de sensibilidade não realizado) e cefazolina (Fator de Corte com valor inferior ao valor da média das respostas analíticas das amostras brancas para as duas transições).

Os resultados alcançados na validação que foi executada em 0,75 da concentração alvo (tab. 27) também podem ser considerados satisfatórios para o método proposto, com exceção da sensibilidade para a segunda transição do sulfatiazol que está abaixo do valor esperado. Para as duas transições da amoxicilina e primeira transição da ampicilina o teste de sensibilidade do método não foi realizado, pois o valor de F_c encontrado foi negativo. Cabe ressaltar que a sensibilidade para a segunda transição da ampicilina foi de 100% e o valor de F_c encontrado foi maior que o valor de T, ou seja, pode ser usada na triagem sendo necessário confirmar a presença da ampicilina por outro método, que deverá ser validado pelo laboratório, caso seja utilizado esse valor de concentração para o analito na rotina de análise.

Tabela 27 - Resultados encontrados para os analitos na validação realizada em 0,75 da concentração alvo de triagem

Analito	1ª Transição				2ª Transição			
	$F_c / T_{\text{valor}} / B$	CC_{β}	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensib. (%)	$F_c / T_{\text{valor}} / B$	CC_{β}	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Sensib. (%)
Espectinomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100
Estreptomomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100
Dihidroestreptomomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100
Kanamomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	1,56	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	1,12	100
Gentamicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	23,38	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	17,90	100
Neomicina	$B > F_c < T_{\text{valor}}$	>Cval	38,03	100	$B > F_c < T_{\text{valor}}$	>Cval	46,69	100
Apramicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	31,43	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	22,60	100
Higromomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	1,46	100
Amicacina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	8,04	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	6,09	100
Tobramomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	27,82	100	$F_c < B$	>Cval	1676,55	100
Lincomomicina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100
Oxitetraciclina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100
Clortetraciclina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100
Tetraciclina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	1,08	100
Doxiciclina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	7,36	100
Norfloxacina	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100	$F_c > T_{\text{valor}}$	<Cval	<1	100

Cont. tabela 27

Ciprofloxacina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Enrofloxacin	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sarafloxacin	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Acido Oxolínico	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Acido Nalidíxico	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Flumequina	B > Fc < T _{valor}	>Cval	7,88	100	Fc > T _{valor}	<Cval	20,48	100
Sulfadiazina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfatiazol	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	90
Sulfametazina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfametoxipiridazina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfadoxina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfaquinoxalina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfametoxazol	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	95	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfaclopiridazina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfisoxazole	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfadimetoxina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Sulfamerazina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Eritromicina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Espiramicina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Tilmicosina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Tilosina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Clindamicina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Penicilina V	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Penicilina G	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Amoxicilina	Fc < B _{valor}	<Cval	1,15	-*	Fc < B	>Cval	3,17	-*
Ampicilina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	-*	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Oxacilina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Cloxacilina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100
Nafcilina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	1,59	100
Dicloxacilina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	1,34	100
Cefazolina	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100	Fc > T _{valor}	<Cval	<1	100

* Sensibilidade não foi calculada.

Nota: LD – limite de detecção; Os resultados calculados de LD que apresentaram valores inferiores a 1 (um) µg.kg⁻¹ foram apresentados pelo símbolo (<) seguindo de 1.

Cval – Concentração alvo de triagem usada na validação.

B – três vezes o valor da área apresentada no tempo de retenção de cada analito (duas transições) nas amostras brancas de matriz ovo.

Sensib. – Sensibilidade

F_c – Fator de Corte ou Cutt-off Factor; T_{valor} - Threshold Value

O procedimento de validação mostrou-se eficiente para a grande maioria dos analitos, mas foram detectados valores do Fator de Corte inferiores a T_{valor} para a segunda transição da tobramicina, valores variando entre o T_{valor} e a média das respostas analíticas das amostras brancas para as duas transições da neomicina e para a primeira transição da flumequina e valor do Fator de Corte inferior à média das respostas

analíticas das amostras brancas para as duas transições da amoxicilina. Contudo, para todos os analitos resultados satisfatórios foram obtidos para, pelo menos, uma transição quando validados no valor de concentração alvo, o que permite o seu uso para a identificação do analito pelo método de triagem proposto. A robustez do método será avaliada durante sua utilização na rotina de análises do laboratório.

5. Conclusões

- O método de CL-EM/EM proposto permite rápida e eficiente triagem dos analitos em ovos estando de acordo com os requerimentos da Decisão 2002/657/EC da Comissão Europeia.
- O método pode ser utilizado na rotina do laboratório para a triagem e confirmação de 44 analitos.
- A amoxicilina e a ampicilina apresentaram resultados inaceitáveis para as intensidades relativas dos íons, nas condições utilizadas neste procedimento de validação. Contudo, na concentração de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 37,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente, o método pode ser utilizado para triagem desses analitos.
- Devido ao interferente no reagente utilizado no processo de extração por TCA a 5% a flumequina, nas condições utilizadas neste procedimento de validação, só poderá ser triada pelo método.

CAPÍTULO III

PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM OVOS

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o método validado com a presença de resíduos de antimicrobianos em ovos e o tempo de permanência desses resíduos foram utilizadas 600 galinhas de postura, da linhagem Hy-Line, com 40 semanas de idade, que foram divididas em seis grupos. Cinco grupos receberam ração contendo antimicrobianos e um grupo controle que não recebeu ração contendo antimicrobianos. As classes utilizadas foram quinolonas (enrofloxacina), tetraciclina (oxitetraciclina e doxiciclina), lincosamidas (lincomicina) e aminoglicosídeos (neomicina). Os ovos produzidos pelas galinhas foram coletados diariamente a partir do dia zero, quando nenhum grupo recebeu ração com antimicrobiano e por mais 15 dias (cinco dias de medicação e dez dias após a suspensão do uso do medicamento). Cada grupo amostral foi composto por seis repetições e cada repetição foi composta por dez ovos, totalizando 60 ovos/tratamento/dia. As 576 amostras geradas foram analisadas pelo método qualitativo e confirmatório validado para a determinação de multirresíduos em ovos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Dos cinco analitos pesquisados apenas a neomicina não gerou resíduos detectáveis nos ovos. Resíduos de lincomicina, oxitetraciclina, doxiciclina, enrofloxacina e seu metabólito (ciprofloxacina) foram detectados desde o dia um do período experimental até o último dia do experimento em todas as amostras analisadas.

Palavras-chave: ovos, resíduos, antimicrobianos, CL-EM/EM.

ABSTRACT

Aiming to assess the method validated by the existence of antimicrobial residues in eggs and the length of stay of such residues we used 600 laying hens, Hy-Line, 40 weeks old, which were divided into six groups. Five groups received feed containing antimicrobials and a control group that did not receive feed containing antimicrobials. The classes used were quinolones (enrofloxacin), tetracyclines (oxytetracycline and doxycycline), lincosamides (lincomycin) and aminoglycosides (neomycin). The eggs produced by hens were collected daily from day zero, when no group received feed containing antimicrobial and for another 15 days (five days of medication and ten days after discontinuation of the drug). Each group was composed of six replicates and each replicate consisted of ten eggs, totaling 60 eggs per treatment per day. The 576 generated samples were analyzed by qualitative and confirmatory method validated for the determination of multiresidue in eggs by liquid chromatography coupled to mass spectrometry sequence. Out of the five analytes studied, only neomycin did not generate detectable residues in eggs. Residues of lincomycin, oxytetracycline, doxycycline, enrofloxacin and its metabolite (ciprofloxacin) were detected from day one of the trial until the last day of the experiment in all samples analyzed.

Keywords: eggs, residue, antimicrobials, LC-MS/MS

1. Introdução

Na avicultura moderna, utiliza-se um grande número de medicamentos no dia-a-dia da produção e muitos deles são adicionados, em massa, à ração ou na água de beber (Kan & Petz, 2001; Kan, 2003) como promotores de crescimento, para prevenção de doenças ou tratamento ou, ainda, empregados nas situações de estresse, como movimentação, vacinação ou debicagem. Os medicamentos também podem ser ingeridos de forma não intencional, via ração, por contaminação durante a produção nas fábricas (moinhos) ou no transporte (Donoghue et al., 1997; Donoghue, 2003; Kan, 2003).

Para aprovar o uso de medicamentos o Food and Drug Administration (FDA) exige o desenvolvimento de método oficial de análise para avaliar a concentração de resíduos nos tecidos comestíveis. Contudo, o FDA não pode exigir métodos em tecidos que não fazem parte da reivindicação do uso dos medicamentos. Um exemplo dessa situação seria exigir método para enrofloxacin em ovos quando não há pedido de aprovação do uso para galinhas poedeiras.

Em alguns países, como os Estados Unidos, o uso de antibióticos como promotores de crescimento é autorizado, porém esse tipo de utilização é proibido na União Europeia desde 2006 (Companyó et al., 2009). Segundo Goetting et al. (2011) a presença de resíduos em ovos deve ser uma preocupação, pois apesar de haver poucos medicamentos registrados para uso em galinhas poedeiras, vários estão aprovados para o uso em produção de outras espécies.

Os aditivos para uso em rações de aves começaram a ser proibidos no Brasil a partir de 1998. Atualmente, as drogas proibidas como aditivos são cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas, arseniacais, antimoniais, olaquinox e violeta genciana. O cloranfenicol e

nitrofuranos são proibidos inclusive para uso terapêutico desde 2003 (Santana et al., 2011). Segundo esses autores descreveram é indispensável que as indicações técnicas de todos os antimicrobianos sejam rigorosamente seguidas sobre o uso nas rações. Entretanto, isso não é suficiente, sendo necessário que se amplie o programa de fiscalização e controle de resíduos nos produtos finais, pois não é garantido que a proibição elimine o uso, uma vez que há deficiência na fiscalização de venda e de uso de medicamentos veterinários e de promotores de crescimento.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Formação do Ovo e Resíduos de Medicamentos

O ovo, que inicia sua formação no ovário, se desenvolve a medida que caminha pelos compartimentos do oviduto (infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina), desta maneira, seus três principais componentes (gema, albúmen e casca) são formados em etapas diferenciadas. No ovário forma-se a gema com a incorporação de sais minerais, proteínas e lipídios, que são produzidos no fígado e transportados pela circulação para os folículos em desenvolvimento (oócito). A gema, que leva de sete a onze dias para amadurecer e, após a ovulação, entra no oviduto, onde é envolvida por várias camadas de albúmen no magno. Este processo de formação do albúmen ocorre em aproximadamente duas a três horas. Após a deposição do albúmen na gema, e formação da membrana da casca no istmo, ocorre a formação da casca do ovo no útero (o processo de formação da casca pode levar de 18 a 20 horas). O processo de formação de um ovo, após a ovulação, dura aproximadamente 25 horas (Donoghue et al., 1997; Kan, 2003).

O ovário de poedeiras em produção ativa contém três tipos de folículos que estão,

simultaneamente, em diferentes estágios ou fases de desenvolvimento, são elas: a fase de desenvolvimento lento, que pode levar meses ou até mesmo anos (os folículos muito pequenos são também chamados de folículos brancos por não haver sido realizado o depósito de carotenóides); a fase intermediária de crescimento (com duração média de 60 dias); e a fase de crescimento rápido que dura cerca de 10 dias. Nesse

período o peso do folículo aumenta exponencialmente, passando de um a 20 gramas (fig. 31). Como um folículo ovula aproximadamente a cada 24 horas, cerca de 10 folículos se apresentam, ao mesmo tempo, em diferentes fases do crescimento rápido (Donoghue e Myers, 2000). A fig. 32 demonstra o ovário com folículos em diferentes fases de desenvolvimento.

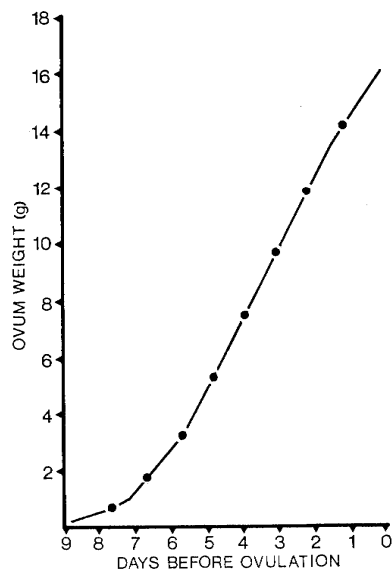


Figura 31 - Curva de crescimento folicular
Fonte: Kan, 2003.

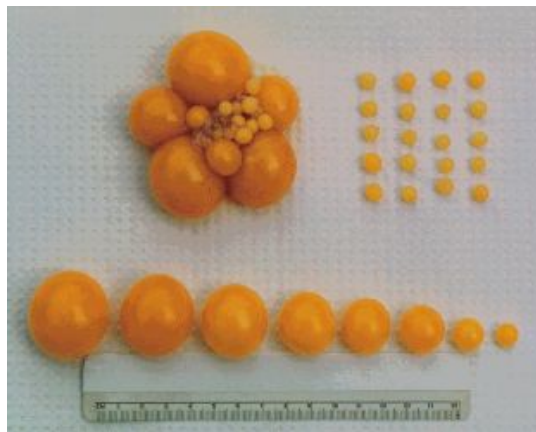


Figura 32 - Fotografia de um ovário de galinha intacto (centro superior) e dissecado com as diferentes fases de formação da gema.
Fonte: Donoghue e Myers, 2000.

Alguns medicamentos veterinários possuem ação local enquanto outros são designados para agir sistemicamente e, com isso, serão absorvidos pelo trato digestivo da galinha. Quando esses compostos atingem a corrente sanguínea poderão ser distribuídos por todo o organismo. Em poedeiras, pode-se incluir o ovário e o oviduto. O processo fisiológico de produção de ovos e as características físico-químicas dos compostos químicos determinarão o comportamento farmacocinético e a distribuição para os ovos. Portanto, resíduos de medicamentos poderão ser detectados tanto na gema quanto na clara após o uso intencional ou não. Além disso, devido às características próprias de formação do ovo, dias ou semanas após o tratamento podem ser necessários para a obtenção de ovos isentos de resíduos do medicamento (Kan & Petz, 2001; Goetting et al., 2011).

A diminuição de resíduos de medicamentos veterinários em ovos depende da concentração plasmática dos fármacos. Os medicamentos que são rapidamente eliminados do organismo desaparecem da clara em dois a três dias após cessar a exposição, enquanto que na gema o desaparecimento leva cerca de dez dias. Entretanto, se o nível de exposição for muito alto e o medicamento se depositar na gema, acumulando-se nos diferentes estágios de desenvolvimento, é possível detectar fármacos em folículos de estágio intermediário e, com isso, encontrar resíduos após 70 dias da exposição. A gema é considerada como o principal local para a presença de resíduos de medicamentos. Entretanto, alguns medicamentos são encontrados em maior concentração na clara, como as sulfonamidas, espiramicina, oxitetraciclina e a sulfamonometoxina. Logo, a dosagem dos medicamentos para galinhas poedeiras, mesmo quando rapidamente excretados, pode expor o consumidor a ovos contendo resíduos (Donoghue & Myers, 2000; Goetting et al., 2011).

Donoghue et al. (1997), demonstraram a presença de resíduos de ampicilina em ovos até cinco dias após o fim da medicação. Provavelmente, esses resíduos foram incorporados e armazenados em gemas pré-ovulatórias. Os autores concluíram que a presença do resíduo após a interrupção da medicação não pode ter sido causada por transferência pelo plasma. Essa conclusão é suportada pela característica de curta meia-vida do composto e pela sensibilidade do método utilizado (limite de detecção $0,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$), que não conseguiu detectar a ampicilina no plasma um dia após a suspensão da medicação.

O desenvolvimento pré-ovulatório das gemas foi considerado por Donoghue e Myers (2000) como um importante momento para o armazenamento de resíduos e outros contaminantes devido à fisiologia da galinha de postura. Mesmo medicamentos de baixa propriedade lipofílica e meia-vida curta (30 minutos), tais como a ampicilina, podem ser transferidos e armazenados nas gemas por dias ou semanas antes da postura. Isto tem implicação significativa na segurança do alimento, pois os ovos podem conter níveis elevados de resíduos de medicamentos por um período prolongado.

Segundo Donoghue (2003), a deposição de resíduos na gema ou albúmen pode ser dependente das propriedades físico-químicas do medicamento. Algumas características da substância, tais como tendência para se ligar a proteínas do plasma, hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade, capacidade para se mover por tipos diferentes do tecido podem ser responsáveis por sua distribuição. Porém, Martinez em 1998, descreveu que a cinética de um medicamento nem sempre pode ser prevista a partir de suas propriedades químicas e que as diferenças verificadas na distribuição dos resíduos entre a gema e a clara acontecem devido às diferentes propriedades físico-químicas que obviamente condicionam a farmacocinética

das substâncias. Desta maneira, a distribuição dos resíduos dos medicamentos pode ocorrer de diferentes formas. A droga pode estar ligada às proteínas plasmáticas, o que determina a possibilidade/disponibilidade das substâncias de se distribuírem para os vários tecidos; o peso molecular do resíduo também pode determinar sua distribuição, pois pode proporcionar facilidades em se difundir passivamente pelas membranas celulares; a solubilidade lipídica da droga (medida pelo coeficiente de partição álcool/água) e os valores de pKa que determinam a ionização ou não ionização das moléculas também podem influenciar na distribuição dos fármacos pelos diferentes tecidos, por interferir na penetração das membranas biológicas.

A quantidade de deposição de um fármaco no ovo é dependente e proporcional à quantidade de material que se deposita diariamente para a formação das camadas da gema em desenvolvimento. As gemas, nos últimos estágios de desenvolvimento, podem incorporar mais resíduos nas camadas externas. Por outro lado, as gemas em fases mais precoces do desenvolvimento incorporam menos resíduos (Donoghue et al., 1996; Donoghue & Myers, 2000).

A farmacocinética da deposição de resíduos em gema e clara de ovo apresenta as seguintes características distintas: os resíduos de medicamentos aparecem em primeiro lugar na clara do ovo, pelo menos quando a droga é distribuída para este compartimento; resíduo em clara de ovo é

um reflexo dos níveis plasmáticos dos medicamentos e, portanto, mostram um nível constante; resíduos na gema refletem os níveis plasmáticos durante os dez dias de crescimento rápido, assim, dependendo do tempo de exposição ao fármaco em relação ao crescimento da gema o nível pode aumentar, ser constante ou diminuir; resíduos de medicamentos em gema geralmente requerem exposição por cerca de oito a 10 dias para atingir um nível constante. Por outro lado, uma única exposição pode ser suficiente para detecção na clara ou gema de ovo dependendo das características do medicamento e da sensibilidade do método analítico usado; o desaparecimento dos resíduos da clara depende do nível plasmático do medicamento, aqueles que rapidamente são eliminados também desaparecem em cerca de dois a três dias após a suspensão da medicação, contudo, o desaparecimento de resíduos da gema geralmente leva cerca de dez dias; se o nível de exposição for muito elevado e o limite de detecção da metodologia de análise for muito baixo, os resíduos depositados nas gemas que estão na fase intermédia do crescimento serão detectáveis (Kan & Petz, 2000; Donoghue & Hairston, 2000). Esta última característica pode explicar a presença de resíduos de cloranfenicol em ovos até 70 dias após a administração (Arnold & Somogyi, 1986).

A tab. 28 apresenta resultados de trabalhos experimentais onde a exposição das aves aos antibióticos foi suficiente para detectar níveis constantes de resíduos em clara e gema de ovo (Kan, 2003).

Tabela 28 – Dados compilados da literatura sobre a presença de resíduos de medicamentos em clara e gema

Composto	Quantidade presente na clara mg.kg ⁻¹	Quantidade presente na gema mg.kg ⁻¹	Modo de exposição ao medicamento
Sulfanilamida	35	43	1000 mg.L ⁻¹ na água por 8 dias
Sulfadiazina	0,32	0,18	400 mg.L ⁻¹ na água por 5 dias
Sulfadimetoxina	8,2	1,6	500 mg.kg ⁻¹ na ração por 14 dias
Sulfamerazina	23	6	2000 mg.kg ⁻¹ na ração por 25 dias

Cont. tabela 28

Sulfaquinoxalina	2,3	2,0	200 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
Clortetraciclina	0,1	0,4	600 mg.kg ⁻¹ na ração por 5 dias
Doxiciclina	0,015	<0,01	1,1 mg.kg ⁻¹ na ração por 21 dias
	0,08	0,04	6,7 mg.kg ⁻¹ na ração por 21 dias
	0,15	0,07	11,5 mg.kg ⁻¹ na ração por 21 dias
	0,1	0,06	400 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
Oxitetraciclina	<0,05	0,2	400 mg.L ⁻¹ 7 dias
	0,21	0,25	500 mg.kg ⁻¹ na ração por 14 dias
	0,17	0,5	600 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
	0,6	0,5	2000 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
	0,1	0,15	200 mg.kg ⁻¹ na ração por 14 dias
Tetraciclina	0,1	0,3	5 mg.kg ⁻¹ na água por 5 dias
Enrofloxacina	1,1	0,18	5 mg.kg ⁻¹ na água por 5 dias
Ciprofloxacina	< 0,15	5	8000 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
Tilosina	5	1,54	0,5 g.L ⁻¹ na água por 7 dias
Eriromicina	0,47	0,32	400 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
Espiramicina	0,40	2,2	1000 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
	3	4,2	0,5 g.L ⁻¹ na água por 7 dias
	2,7	0,05	500 mg.g ⁻¹ na ração por 14 dias
Tilosina	0,05	5	8000 mg.kg ⁻¹ na ração por 7 dias
	5	1	0,5 g.L ⁻¹ na água por 7 dias
	1		

Fonte: adaptado de Kan, 2003.

Os resultados indicaram que as sulfonamidas apresentaram níveis apreciáveis, tanto na clara quanto na gema e que as tetraciclina, como um grupo, mostraram resultados divergentes. Compostos lipofílicos, como a doxiciclina apresentaram níveis mais altos na clara. Contrariamente, a oxitetraciclina e a clortetraciclina mostraram níveis significativos na gema.

2.2 Administração de Medicamentos e Período de Carência

Devido à natureza incomum de formação do ovo, muitos princípios de transferência de resíduos para animais domésticos não se aplicam às aves. Mesmo quando a medicação é realizada em apenas um dia é possível encontrar ovos contendo níveis variados de resíduos por semanas após a retirada da droga. Cada folículo em desenvolvimento pré-ovulatório age como um compartimento farmacocinético único, independente da concentração presente nos demais folículos. Portanto, a avaliação do padrão ou duração de resíduos em ovos com base na meia-vida do medicamento, como é feito em animais domésticos, pode expor o consumidor a resíduos violatórios por um

período prolongado de tempo (Donoghue, 1998).

Não é viável avaliar a taxa de transferência para todos os medicamentos disponíveis em todas as concentrações de dosagem possíveis. A maioria das proteínas depositadas como clara de ovo são, provavelmente, formadas no dia anterior à secreção e, desta maneira, se os medicamentos são administrados após esse período, espera-se que os resíduos não sejam sequestrados no magno e os ovos produzidos estejam livres de resíduos e seguros para consumo. Porém, algumas proteínas são sintetizadas durante o processo de formação do albúmen em volta do óvulo, além disso, água é adicionada ao albúmen durante a passagem pelo trato reprodutivo. Se os resíduos forem incorporados durante essas últimas fases de formação do albúmen, então, os mesmos poderão estar presentes no primeiro ovo recolhido no dia seguinte a medicação (Donoghue & Hairston, 2000).

A utilização terapêutica de medicamentos de uso veterinário em galinhas poedeiras leva ao aparecimento, nos ovos, de resíduos das substâncias ativas administradas. O

estabelecimento de períodos de carência para os medicamentos visa proteger a saúde dos consumidores, face a um eventual risco decorrente da exposição a esses mesmos resíduos. Contudo, nos sistemas intensivos da produção avícola, em particular de galinhas poedeiras, o respeito pelo intervalo de segurança pode conduzir a importantes prejuízos financeiros para os produtores, uma vez que os ovos não podem ser utilizados para consumo humano durante o tratamento e o período de tempo correspondente ao intervalo de segurança (Pinto, 2011).

A oxitetraciclina é amplamente utilizada como medicamento veterinário, contudo, o consumo de produtos de origem animal, contendo resíduos do medicamento, pode provocar sérios efeitos sobre a saúde, tais como indução de reações alérgicas para alguns indivíduos, desenvolvimento de resistência bacteriana, teratogenicidade no primeiro trimestre da gravidez e descoloramento dos dentes. A proteção da saúde pública contra possíveis efeitos nocivos dos resíduos de medicamentos veterinários é uma preocupação relativamente recente. A intenção inicial era a de alcançar a eliminação completa de todos os vestígios de resíduos de medicamentos em produtos alimentares. Portanto, os medicamentos foram, inicialmente, aprovados com base na ausência de resíduos (Furusawa, 1999).

Com o objetivo de verificar a taxa de depleção da oxitetraciclina em ovos e, conseqüentemente, estabelecer um período de carência Omija e colaboradores (1994) trabalharam com 20 galinhas poedeiras divididas em quatro grupos ($n = 5$). Oxitetraciclina foi administrada via água em concentrações de 0, 400, 600 e 800 mg.L^{-1} , respectivamente, durante sete dias. Os ovos foram colhidos por até 17 dias após a administração do medicamento e a presença de resíduos foi analisada por método microbiológico. O pico máximo de

oxitetraciclina foi observado na clara dois dias antes que na gema sendo o período de depleção na clara menor do que na gema (dias 10 e 13, respectivamente). Os autores observaram que a oxitetraciclina atingiu pico mais rápido na clara, contudo, sua persistência foi maior na gema e concluíram, assim, que o período de carência é dependente da concentração do antimicrobiano administrado.

Donoghue e Hairston (1999), em estudo realizado para determinar a presença de resíduos de oxitetraciclina nos componentes do ovo, utilizaram 20 galinhas poedeiras distribuídas em dois grupos que receberam ração contendo 50 ou 200 g.ton^{-1} de oxitetraciclina, durante cinco dias. Não foram observados resíduos de oxitetraciclina na gema durante e após a suspensão da medicação nos ovos obtidos das galinhas que receberam ração contendo 50 g.ton^{-1} de oxitetraciclina. Contudo, na clara, no quinto dia e um dia após a suspensão da medicação (ração contendo 200 g.ton^{-1}), foram detectados resíduos com concentrações muito próximas do limite de sensibilidade do ensaio (117 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Os autores concluíram que, a contaminação cruzada da ração com oxitetraciclina não seria capaz de produzir níveis consistentemente detectáveis de resíduos em ovos.

Donoghue & Hairston (2000), tabalhando com oxitetraciclina, demonstraram que, resíduos de medicamentos solúveis em água se incorporam no albúmen do ovo durante as duas últimas fases de formação do ovo, pouco antes da postura. Por isso, produtores, veterinários ou agências reguladoras devem considerar a possibilidade de que os resíduos estarão presentes já nos primeiros ovos produzidos após a introdução da medicação.

Hintono et al. (2007) analisaram ovos de poedeiras que receberam oxitetraciclina, via água de beber, na dose de 2 g.L^{-1} , durante sete dias. Os resultados indicaram a presença de resíduos de oxitetraciclina na clara a

partir do segundo dia de tratamento e na gema a partir do quarto dia. Os resíduos ainda foram encontrados no sétimo dia após a interrupção da administração, contudo, em concentração inferior ao limite máximo permitido. Somente após 14 dias, os ovos não apresentaram mais resíduos do medicamento.

Segundo Goetting e colaboradores (2011) os níveis de resíduos encontrados nos ovos e a taxa de depleção do medicamento dependem diretamente do método de administração e da dose utilizada. A tab. 29 apresenta dados compilados da literatura para a presença de resíduos de oxitetraciclina e doxicilina em ovos após o uso de diferentes dosagens e duração do tratamento.

Tabela 29 – Perfil de resíduos de oxitetraciclina e doxicilina em ovos, após tratamento de galinhas poedeiras, e acompanhamento da eliminação do resíduo no ovo após a retirada do medicamento

Tetraciclina	Dose	Via	Duração tratamento (dias)	Presença do resíduo (dias)*
	0,1 g.L ⁻¹	Água	5	Gema: 0; Clara: 0
	0,25 g.L ⁻¹		5	Gema: 4; Clara: 3
	0,4 g.L ⁻¹		7	Gema: 3; Clara: 0
	0,5 g.L ⁻¹		5	Gema: 4; Clara: 3
	0,5 g.L ⁻¹		7	Gema: 10; Clara: 6
	0,6 g.L ⁻¹		7	Gema: 5; Clara: 1
	2,0 g.L ⁻¹		7	Gema: 12; Clara: 9
Oxitetraciclina	20 mg.kg ⁻¹	Ração	7	Gema: 0; Clara: 0
	50 mg.kg ⁻¹		28	Ovo inteiro: 0
	50 mg.kg ⁻¹		5	Gema: 0; Clara: 0
	100 mg.kg ⁻¹		28	Ovo inteiro: 0
	200 mg.kg ⁻¹		5	Gema: 0; Clara: 1
	300 mg.kg ⁻¹		7	Gema: 2; Clara: 1
	300 mg.kg ⁻¹		7	Gema: 4; Clara: 2
800 mg.kg ⁻¹	7	Ovo inteiro: > 10		
Doxiciclina	0,5 g.L ⁻¹	Água	7	Gema: 27; Clara: 25

Fonte: Adaptado de Goetting et al. (2011).

Nota: * Dias depois da retirada do medicamento até o resíduo não mais ser detectado no ovo (clara ou gema).

Estudos com poedeiras que receberam ração experimentalmente contaminada com doxicilina foram realizados por Vandenberg et al. (2012). As rações foram produzidas com concentrações de 2,5%, 5,0% e 10% da dose terapêutica (250 mg.kg⁻¹) e, por isso, foram consideradas rações com contaminação cruzada. Amostras de ovo inteiro, clara e gema, coletadas durante o período de tratamento e após a retirada do medicamento, foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. Uma fase de *plateau* foi alcançada em três a cinco dias do experimento e, para o grupo que recebeu a ração com 10% de contaminação, a doxicilina foi detectada no ovo integral, clara e gema até o dia 13 do período experimental.

Um estudo sobre a taxa de depleção de resíduos de enrofloxacin em ovos foi realizado após a administração em galinhas poedeiras na dose de 12 mg.dia⁻¹, durante cinco dias. Albúmen e gema foram separadas e os níveis de resíduos foram determinados utilizando a metodologia da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. O primeiro resultado positivo encontrado foi observado 48 horas após o início do tratamento e o nível máximo foi encontrado no terceiro dia do tratamento. Neste estudo, os picos de enrofloxacin e ciprofloxacina aumentaram gradualmente até o quinto dia e foi possível detectá-los, em níveis consideráveis, até o dia 12 do experimento quando reduziram

para valores inferiores a $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Lolo et al., 2005).

Estudos com o uso de fluoroquinolona foram conduzidos com o objetivo de determinar a transferência de resíduos para os ovos de galinhas poedeiras. Sarafloxacina, radioativamente marcada, foi administrada oralmente a seis galinhas poedeiras, durante cinco dias consecutivos. Os ovos foram coletados durante 15 dias após o tratamento. Gema e clara de ovos foram separadas e analisadas para pesquisar o total de resíduos radioativos. A radioatividade foi detectada na gema e no albúmen no segundo dia de medicação e atingiu nível máximo em 24 horas após a retirada do medicamento. Em seguida, os níveis de sarafloxacina na albumina decresceram e eram indetectáveis dois dias após a última dose. Os níveis na gema diminuíram mais lentamente e foram indetectáveis somente sete dias após a retirada do medicamento (Food and Drug Administration, 2012).

2.3 Avaliação de Resíduos de Antimicrobianos em Ovos

No Brasil, macrolídeos, tetraciclina e lincosamidas não estão sendo avaliados em ovos, sendo que os princípios ativos eritromicina, tilosina, tilmicosina, clindamicina e lincomicina estão sendo pesquisados pelo MAPA em bovinos, suínos, aves e equinos (Brasil, 2012). Em 2011, 180 ovos foram amostrados pelo PNCRC para a pesquisa de cloranfenicol, sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametazina, sulfadiazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol e sulfadimetoxina) e fluoroquinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina) e nenhuma amostra analisada apresentou resultados acima do Limite Máximo de Resíduos estabelecido (Brasil, 2012b).

Para as lincosamidas existem medicamentos veterinários registrados no Brasil com o intuito de tratar e controlar infecções em galinhas poedeiras com base na associação de lincomicina e espectinomicina, e com a recomendação de que os ovos devem ser descartados por até dez dias após a última administração. Contudo, outros produtos com base na mesma associação não são indicados para animais produtores de ovos (Brasil, 2008).

Um levantamento realizado por Pinto (2011) demonstrou que 13,11% das amostras colhidas entre 2000 e 2009, em conformidade com o Plano Europeu de Controlo de Resíduos (PECR), apresentaram resíduos de antimicrobianos, dentre eles: ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, clortetraciclina, doxiciclina e tilmicosina. Cabe ressaltar que sulfonamidas e quinolonas são constituintes de medicamentos autorizados para utilização em aves, mas não para administração a galinhas poedeiras.

Spisso et. al. (2010a) validaram um método para detecção de macrolídeos e lincosamidas em ovos por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial. A validação para a lincomicina foi realizada em 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ o que equivale a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 do LMR. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram de 1,6 e 5,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. Com o método validado foi possível detectar presença de resíduo de lincomicina em uma (01) amostra obtida do mercado, em concentração entre LD e LQ (fig. 33).

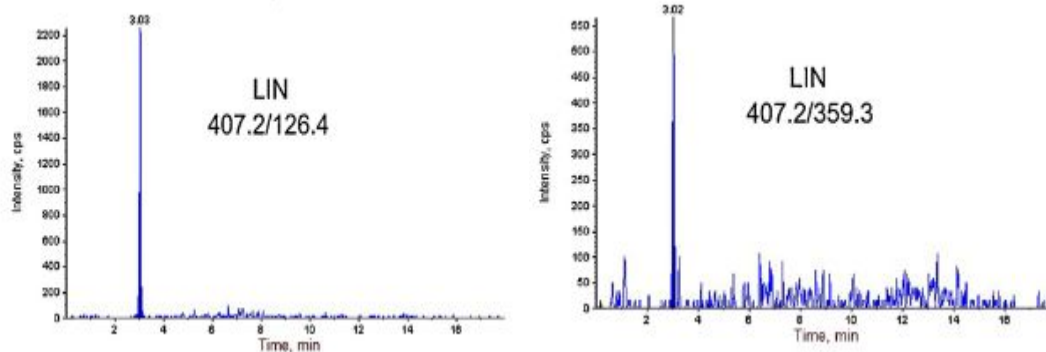


Figura 33 – Cromatograma MRM de amostra de ovo com traços de lincomicina com concentração estimada entre o LD e LQ.

O método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas validado foi utilizado para a identificação e quantificação de resíduos de lincosamidas em ovos comerciais vendidos na região metropolitana do Rio de Janeiro. O método foi aplicado a 100 amostras e os resultados mostraram a presença de lincomicina em níveis residuais em 4% das amostras (Spisso et al., 2010b).

3. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé, Minas Gerais.

As aves utilizadas no experimento foram alojadas em galpão de postura convencional e submetidas a manejo semelhante aos usados nas criações comerciais. Foram utilizadas 600 galinhas de postura, da linhagem Hy-Line, com 40 semanas de idade, alojadas em gaiolas (cinco aves por gaiola), recebendo água e ração à vontade.

Para avaliar a presença de resíduos de medicamentos em ovos foram utilizados cinco compostos de diferentes classes adicionados à ração das aves. As classes utilizadas foram: quinolonas (enrofloxacina), tetraciclina (oxitetraciclina e doxiciclina), lincosamidas (lincomicina) e aminoglicosídeos (neomicina), adquiridos no comércio varejista. As rações contendo

os medicamentos foram produzidas na fábrica da própria fazenda e os medicamentos foram adicionados à ração e homogeneizados com o auxílio de um misturador em “y”.

Os tratamentos, definidos de acordo com o medicamento administrado à ração das aves, foram: grupo controle, ração sem antibiótico; tratamento 01, ração contendo neomicina; tratamento 02, ração contendo lincomicina; tratamento 03, ração contendo oxitetraciclina; tratamento 04, ração contendo doxiciclina; tratamento 05, ração contendo enrofloxacina.

As dosagens dos antimicrobianos usados no experimento "in vivo" foram calculadas com base nas informações constantes na bula que resultaram nas concentrações de 196 mg.kg⁻¹ de sulfato de neomicina; 220 mg.kg⁻¹ de lincomicina; 550 mg.kg⁻¹ de oxitetraciclina; 100 mg.kg⁻¹ de doxiciclina e 100 mg.kg⁻¹ de enrofloxacina na ração.

O período experimental total foi de 16 dias. No dia zero a ração oferecida para todas as aves não continha nenhum medicamento. Após a coleta de todos os ovos do dia zero foi introduzida a ração contendo o medicamento para os cinco grupos tratados. O período total de tratamento foi de cinco dias e, após esse período, ração sem o medicamento voltou a ser oferecida para todas as aves. Amostras de todos os

tratamentos foram coletadas por mais dez dias. Os ovos coletados de todos os grupos foram identificados individualmente com o tratamento e o dia do experimento.

Foram utilizadas 100 aves para cada tratamento e em cada dia do período experimental foram colhidos 60 ovos por tratamento (dez ovos por repetição – seis repetições por tratamento), totalizando 360 ovos por dia. Os ovos foram acondicionados em bandejas e armazenados em caixas de papelão, mantidas em temperatura ambiente (Brasil, 2011) até o envio ao Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM) do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado em Pedro Leopoldo/MG.

O delineamento experimental para as avaliações da presença ou não de resíduos de antimicrobianos nos ovos foi em subparcelas, constituído por seis tratamentos (grupo controle, tratamento 1, 2, 3, 4 e 5). Cada tratamento era composto por seis repetições (A, B, C, D, E e F). Cada amostra foi composta por 10 ovos (500g). Os tratamentos foram posicionados inteiramente ao acaso dentro do galpão de produção. O delineamento experimental (seis tratamentos x seis repetições x 16 dias) gerou um total de 576 amostras para extração e análise por CL-EM/EM pelo método de extração por TCA.

Preparo das Amostras

Cada amostra a ser analisada foi composta por dez ovos ou 500 g de ovo inteiro (Brasil, 2011). O preparo das amostras se deu conforme o descrito no item 1.1.3.

Os ovos foram quebrados e acondicionados em recipientes de plástico. Posteriormente, foram homogeneizados em *Ultra Turrax*. Pesou-se $2,0 \pm 0,1$ gramas da amostra, em

tubo de polipropileno de 50 mL, que foram mantidas congeladas, em temperaturas inferiores a -15°C , até o momento da análise.

Procedimento de Extração e Parâmetros Instrumentais

Para a extração dos compostos foi utilizada o método de TCA a %5 (item 1.1.3 – Extração por Ácido Tricloroacético). As análises das 576 amostras geradas pelo experimento “in vivo” foram divididas em grupos para que em cada dia de injeção fosse analisado um número máximo de 36 amostras. As bateladas foram montadas aleatoriamente entre tratamentos (seis), repetições (seis) e dias do experimento (16). Em cada dia de análise (extração e injeção das amostras no equipamento), além das amostras branco de matriz e branco de reagente, foi utilizada uma amostra “Controle Positivo” fortificada com o *pool* dos analitos validados pela extração com o ácido tricloroacético na concentração de 0,75 do Limite de Referência ou Concentração Alvo de Triagem estabelecida para a validação do método (tab. 9), com exceção da neomicina que foi fortificada em $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$. (tab. 9, item 1.1.4).

As condições de trabalho para o sistema cromatográfico e para o detector de massas foram estabelecidas durante o procedimento de validação e constam nos itens 1.1.2 e 1.2.1 do Capítulo 1.

O acompanhamento do perfil gerado por cada resíduo nas amostras, ao longo de todos os dias do experimento, foi realizado pela análise dos cromatogramas analíticos. Foram monitoradas as duas transições de cada analito e o tempo de retenção esperado para a identificação e confirmação da presença de resíduos dos antimicrobianos utilizados (tab. 30). Os resultados obtidos nos cromatogramas gerados serão apresentados na forma de razão entre áreas (área do pico da primeira transição do analito pela área do pico do padrão interno – sulfafenazol).

Tabela 30 – Transições e tempo de retenção dos antimicrobianos utilizados no experimento “in vivo” e pesquisados nas amostras de ovos

Tratamentos	Análitos	1ª transição (m/z)	2ª transição (m/z)	Tempo de Retenção (minutos)
1	Neomicina	615/161	615/293	5.90
2	Lincomicina	407/126	407/359	4.30
3	Oxitetraciclina	461/201	461/283	4.90
4	Doxiciclina	445/428	445/154	6.30
5	Enrofloxacina	360/342	360/286	5.20

Nota: m/z – razão massa/carga para cada transição monitorada dos analitos.

Em cada cromatograma gerado no CL-EM/EM, como rotina de análise, todos os demais analitos validados pelo método de extração por ácido tricloroacético foram monitorados por suas respectivas transições e tempos de retenção (tab. 11). O valor de razão entre a área dos picos dos analitos com a área do pico do padrão interno foi utilizado para determinar o status da amostra (conforme ou não conforme), de acordo com

o previsto para o método de triagem validado (Capítulo 1).

4. Resultados e Discussão

A tab. 31 apresenta os valores das médias das razões entre áreas obtidas (repetições), por tratamento e dia do experimento.

Tabela 31 – Médias das razões entre as áreas* das seis repetições obtidas a partir das respostas analíticas geradas pelas amostras do experimento “in vivo”

Dia	Grupo Controle	Trat. 1 Neomicina	Trat. 2 Lincomicina	Trat. 3 Oxitetra.	Trat. 4 Doxiciclina	Trat. 5 Enrofloxacina
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
1	0,00	0,00	1,04	0,13	13,30	16,04
2	0,00	0,00	6,87	0,53	38,08	41,50
3	0,00	0,00	9,55	0,88	36,52	61,71
4	0,00	0,00	11,79	1,07	38,66	70,38
5	0,00	0,01	11,66	1,31	48,34	59,70
6	0,00	0,00	10,02	1,09	34,04	63,63
7	0,00	0,00	5,46	0,63	17,13	33,27
8	0,00	0,01	2,93	0,50	9,30	14,57
9	0,00	0,00	1,68	0,48	6,61	8,22
10	0,00	0,00	0,99	0,43	4,71	3,16
11	0,00	0,00	0,78	0,29	4,41	2,72
12	0,00	0,00	0,28	0,21	1,60	0,88
13	0,00	0,00	0,14	0,14	1,30	0,60
14	0,00	0,00	0,08	0,14	0,93	0,54
15	0,00	0,00	0,05	0,13	0,65	0,29

Legenda: Trat. – tratamento; Oxitetra. – oxitetraciclina.

* Razão entre a área do analito e o padrão interno (sulfafenazol).

Avaliando os dados é possível verificar que, não houve detecção de resíduos nas amostras do grupo controle, o que demonstra a não ocorrência de contaminação, e do tratamento 1 (ração contendo neomicina) em nenhum dos dias do período experimental. Contudo, para os demais tratamentos (2, 3, 4 e 5), houve detecção de resíduos nas

amostras obtidas a partir do primeiro dia, ou seja, em menos de 24 horas após o início do fornecimento da ração contendo os medicamentos. Os dados apresentados demonstram a presença de resíduos de lincomicina (tratamento 2), oxitetraciclina (tratamento 3), doxiciclina (tratamento 4) e enrofloxacina (tratamento 5) durante todo o

período de fornecimento da ração contendo os antimicrobianos (dias 1 a 5) e, também, após a suspensão do tratamento (dias 6 a 15).

A neomicina (tratamento 1), medicamento com ação efetiva no trato gastrointestinal, possui pouca absorção e, provavelmente, não foi capaz de atingir, em ovos,

concentrações detectáveis pelo método validado. Para testificar a presença do princípio ativo, o medicamento foi diluído na concentração de trabalho do método de rotina do laboratório para análise de aminoglicosídeos por CL-EM/EM (Almeida et al., 2012). A presença da neomicina foi confirmada como pode ser observado no cromatograma da fig. 34.

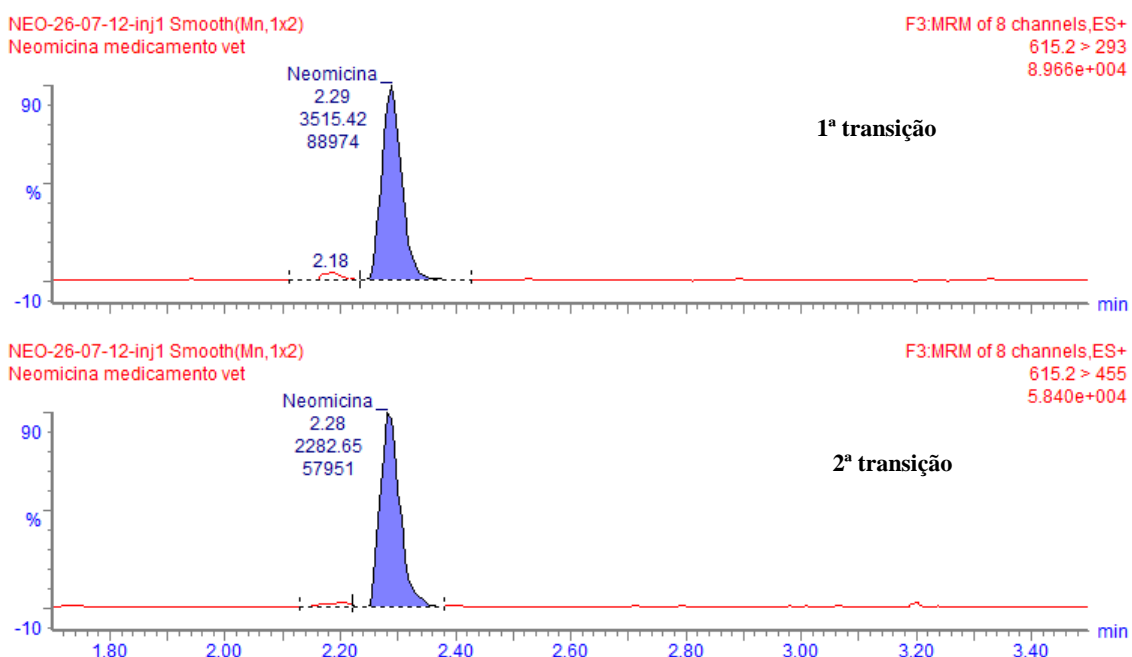


Figura 34- Cromatograma gerado pela injeção do medicamento usado no tratamento 1 para verificar a presença do princípio ativo (neomicina).

Nota: injeção realizada CL-EM/EM, no dia 26 de julho, no modo MRM, das duas transições do analito no tempo de retenção esperado (2.28).

Durante as análises laboratoriais, os extratos do tratamento 1 foram injetados no método de rotina do laboratório para análise de aminoglicosídeos por CL-EM/EM, com o objetivo de verificar a possível presença do resíduo em concentrações mais baixas, que o limite de detecção do método validado, mas que poderiam ser detectadas pelo método de

rotina do laboratório devido ao seu baixo limite de detecção ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$). O analito foi detectado no *pool* de antimicrobianos do Controle Positivo, mas não foi detectado nos estratos das amostras (fig. 35), confirmando os resultados anteriormente encontrados.

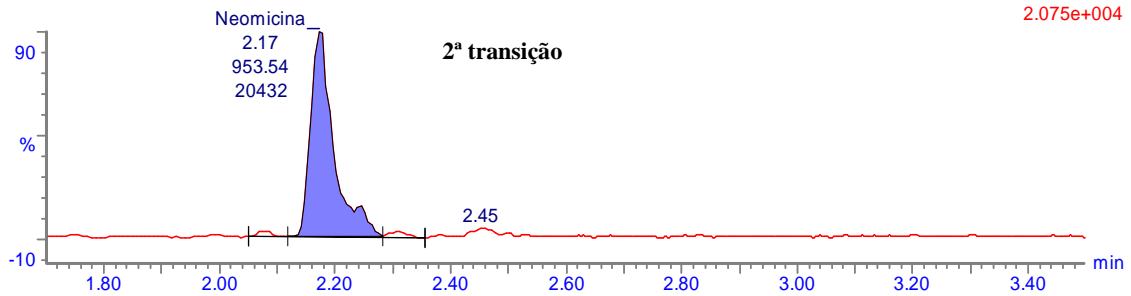
CP-OVO-11-04-12-inj2 Smooth(Mn,1x2)
Controle Positivo OVO 075LMR

F3:MRM of 8 channels,ES+
615.2 > 293
2.562e+004



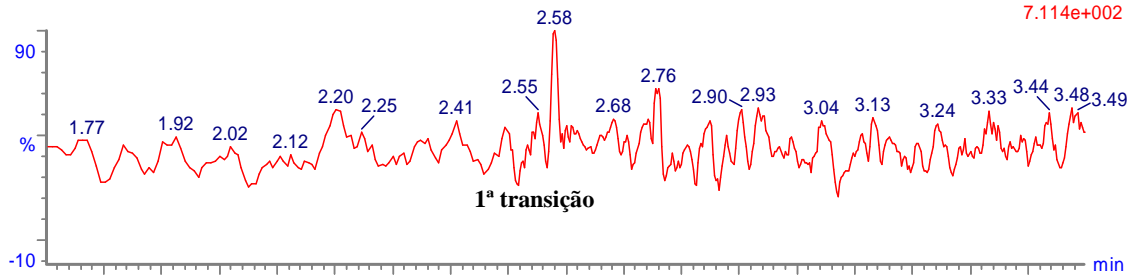
CP-OVO-11-04-12-inj2 Smooth(Mn,1x2)
Controle Positivo OVO 075LMR

F3:MRM of 8 channels,ES+
615.2 > 455
2.075e+004



T1D3A-OVO-11-04-12-inj1 Smooth(Mn,1x2)
Tratamento 1 dia 3 OVO

b F3:MRM of 8 channels,ES+
615.2 > 293
7.114e+002



T1D3A-OVO-11-04-12-inj1 Smooth(Mn,1x2)
Tratamento 1 dia 3 OVO

F3:MRM of 8 channels,ES+
615.2 > 455
4.632e+002

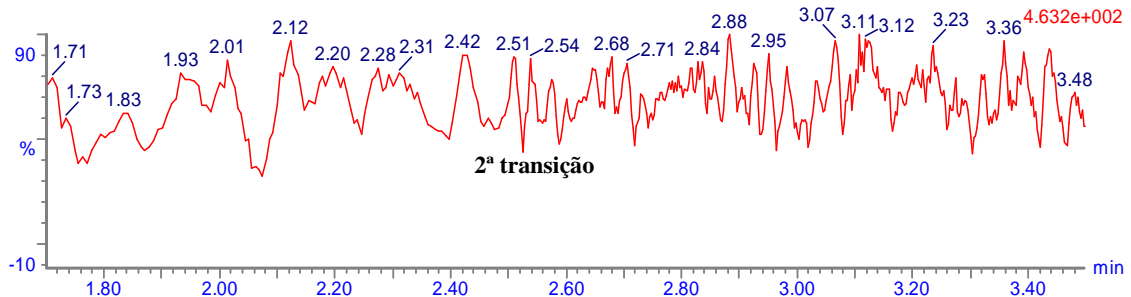


Figura 35 - Cromatogramas das transições da neomicina gerados pela injeção do Controle Positivo contendo o pool de analitos (a) e do extrato da amostra do tratamento 1 (neomicina), dia 3, repetição A (b).

Grupo Controle

Os cromatogramas das amostras do grupo controle foram analisados para verificar a presença das transições dos analitos

validados no método, em seus respectivos tempo de retenção (tab. 30). A fig. 36 ilustra o cromatograma de uma amostra do tratamento 1 (um), repetição C, do dia 5 (cinco) do período experimental.

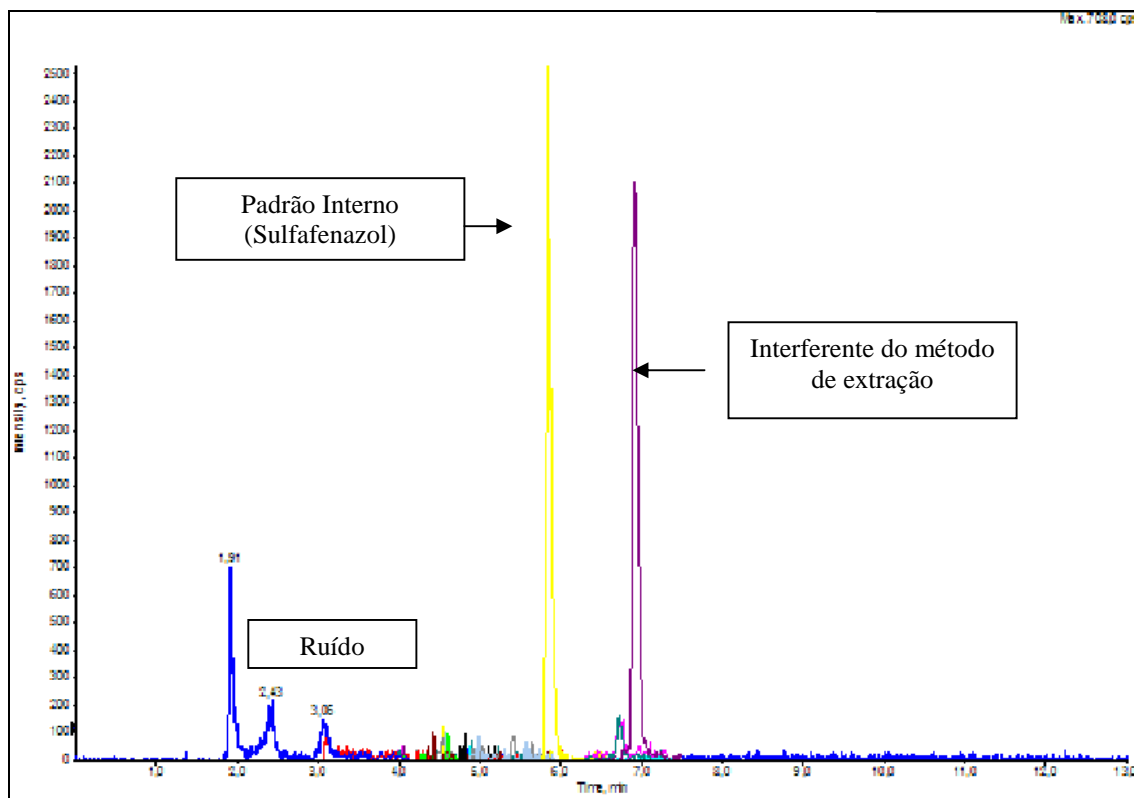


Figura 36- Cromatograma gerado por amostra do tratamento 1 (controle - ração sem antimicrobiano), do dia 5 do período experimental.

Em nenhuma das amostras do grupo controle foi observado pico cromatográfico, no tempo de retenção de cada analito do experimento. Dessa forma, pode-se dizer que não houve, durante o período experimental, nenhum tipo de contaminação da ração com antimicrobianos durante o preparo na fábrica e/ou no tratamento das aves. Contudo, foi possível identificar nos cromatogramas o interferente oriundo do ácido tricloroacético, presente no tempo da flumequina, e o pico gerado pelo padrão interno (sulfafenazol).

Tratamento 1 - Neomicina

Analisando todos os cromatogramas gerados pelas amostras pertencentes ao tratamento 1 e pesquisando a presença das duas transições e o tempo de retenção da neomicina não foram observados picos cromatográficos que identificassem a presença do analito em nenhuma das amostras (seis repetições e 16 dias de experimento), como é possível observar no cromatograma da fig. 37 que ilustra os cromatogramas gerados pelas amostras do tratamento 1 em todos os dias do período experimental, inclusive durante o uso da ração com o medicamento.

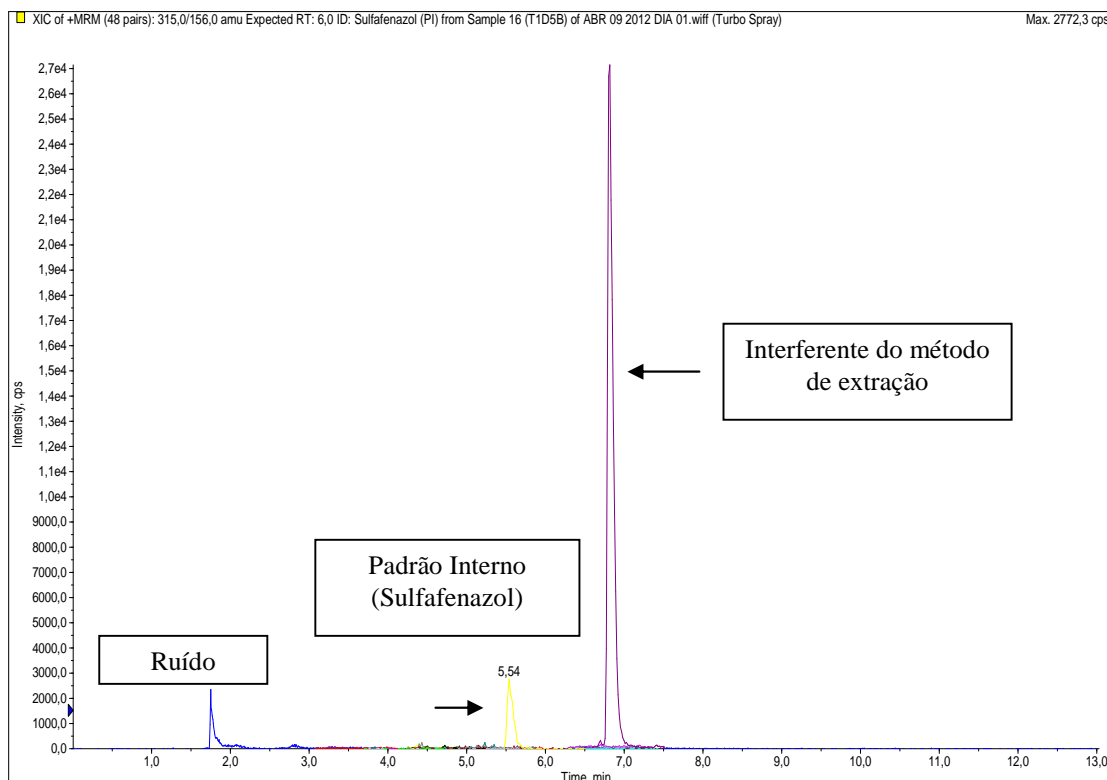


Figura 37 – Cromatograma gerado pela amostra 16 do tratamento 1 (neomicina), no dia 5 do período experimental, repetição B.

A neomicina, que é um aminoglicosídeo produzido pelo *Streptomyces fradiae*, é utilizada primariamente no tratamento de infecções causadas por microrganismos aeróbios Gram-negativos e alguns Gram-positivos. Devido à sua alta toxicidade e baixa eficiência contra *Klebsiella* sp., *E. coli* e *Pseudomas* sp., seu uso fica limitado para o tratamento de infecções intestinais, incluindo o quadro de salmoneloses em perus e frangos (Ito et al., 2005).

A ausência de resíduos de neomicina nas amostras analisadas poderia ser explicada pelas suas propriedades farmacocinéticas, em grande parte atribuídas a sua característica polar. A neomicina não é significativamente absorvida pelo trato gastrointestinal sendo excretada nas fezes depois de administradas por via oral. Para aves, estima-se que apenas 3% da dose administrada seja absorvida, contudo, é raro

encontrar resíduos de aminoglicosídeos em ovos após administração oral (Ito et al., 2005; Goetting et al., 2011).

Segundo Reeves & Swan (1999) a baixa lipossolubilidade da substância, que limita sua difusão pelas membranas biológicas, associada ao baixo percentual de ligação às proteínas plasmáticas (25%) seriam as causas da neomicina não atingir níveis terapêuticos, quando administrada por via oral. Além disso, os aminoglicosídeos, como classe, não são biotransformados de maneira significativa, após administração parenteral, sendo eliminados pela urina na sua forma inalterada. O volume de distribuição é relativamente baixo ($<0,35 \text{ L.kg}^{-1}$), porém, a ligação seletiva aos tecidos pode ocorrer nos rins, onde os resíduos podem permanecer por períodos prolongados (Spinosa, 2011c).

Os resultados deste experimento corroboram com os encontrados por Roudaut (1989), citado por Goetting et al. (2011). O autor pesquisou a taxa de transferência de aminoglicosídeos em ovos quando utilizou diferentes vias de administração do medicamento. Clara, gema e ovo inteiro foram analisados separadamente após a administração oral de dihidroestreptomicina (DHS), neomicina e espectinomicina e após injeção intramuscular de DHS. Os resíduos foram determinados por método de difusão em Agar e a neomicina foi administrada via água na dose de 25 mg.kg^{-1} , durante 5 dias. Apenas a DHS, administrada por via intramuscular, resultou em resíduos detectáveis nos ovos, contudo, a quantidade total de DHS presente nos ovos representou apenas 1% da dose administrada.

Tratamento 2 - Lincomicina

A presença da lincomicina foi pesquisada nos cromatogramas das amostras do tratamento 2. Picos cromatográficos no tempo de retenção esperado para a lincomicina foram observados e, dessa forma, pela análise das duas transições foi possível confirmar a presença do resíduo. A fig. 38 apresenta o pico cromatográfico da lincomicina extraído do cromatograma gerado pelo Controle Positivo (*pool* de analitos) e a fig. 39 apresenta dois cromatogramas de diferentes dias do período experimental (dia 2 e dia 5) nos quais foi possível identificar os picos cromatográficos do resíduo de lincomicina, do padrão interno e do interferente do processo de extração (TCA). Os resultados das 96 amostras do tratamento 2 estão apresentados na tab. 32.

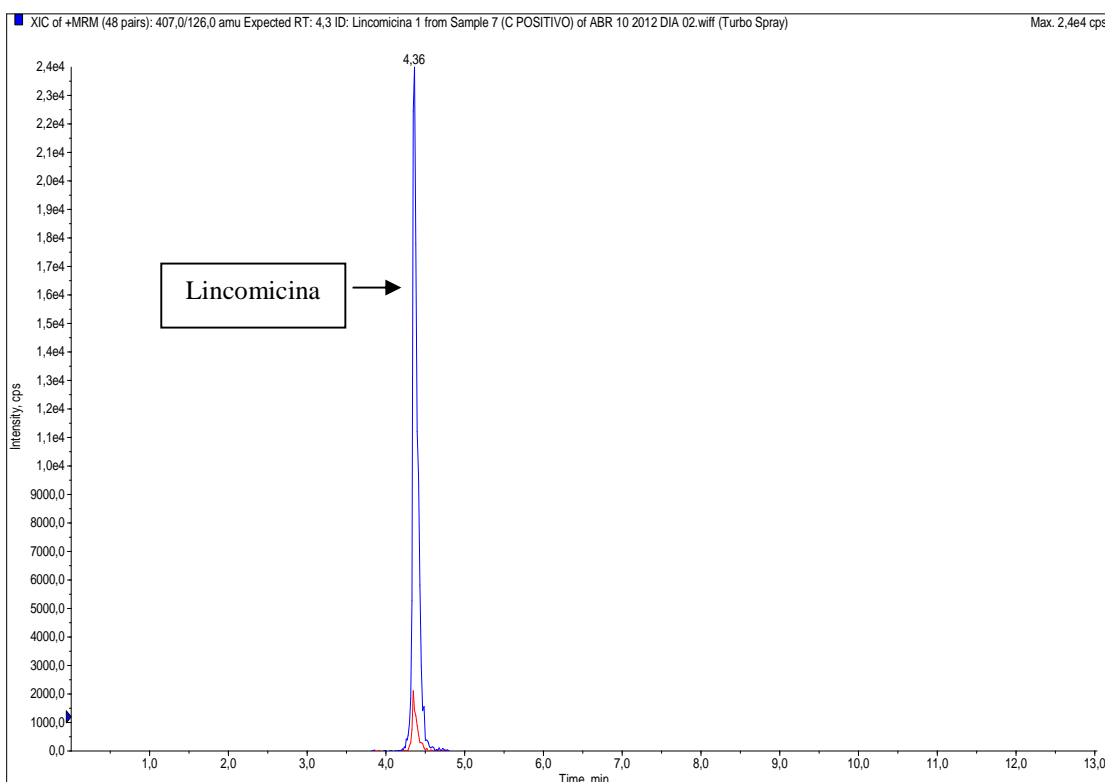


Figura 38 – Cromatograma extraído para isolamento do analito do cromatograma gerado pela injeção do Controle Positivo.

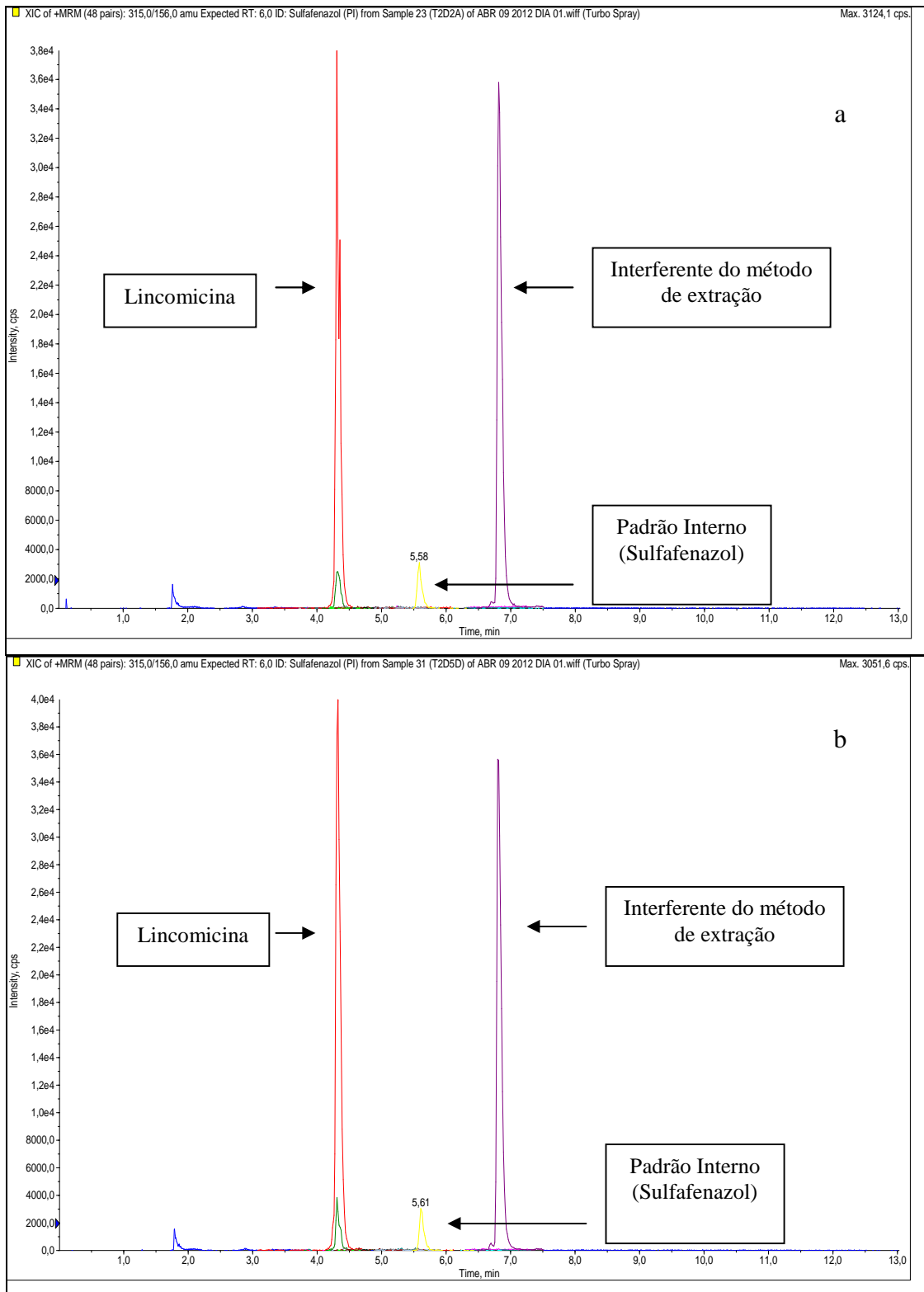


Figura 39 – Cromatogramas gerados pela injeção no CL-EM/EM das amostras T2D2A (a) e T2D5D (b) para pesquisa de resíduos de lincomicina nos ovos.

Nota: T – tratamento; D - dia do período experimental e A e D – repetições.

Tabela 32 - Médias das razões entre áreas das amostras do tratamento 2 para todos os dias do período experimental

Dias	Médias	Coefficiente de Variação
0	0,00	-
1	1,04	19,19
2	6,87	26,68
3	9,55	15,37
4	11,79	17,62
5	11,66	21,62
6	10,02	31,15
7	5,42	27,41
8	2,93	53,3
9	1,68	18,21
10	0,99	31,85
11	0,78	32,8
12	0,28	38,42
13	0,14	24,14
14	0,08	38,31
15	0,05	43,74

A partir das médias das respostas de razão entre áreas é possível analisar a cinética da lincomicina. A razão entre áreas (área do pico cromatográfico da lincomicina pela área do pico cromatográfico do padrão

interno) do controle positivo permitiu analisar o perfil do analito ao longo dos dias experimentais (gráf. 1). O controle positivo para a lincomicina foi fortificado na concentração de $37,5 \mu\text{g} \cdot 67\text{kg}^{-1}$.

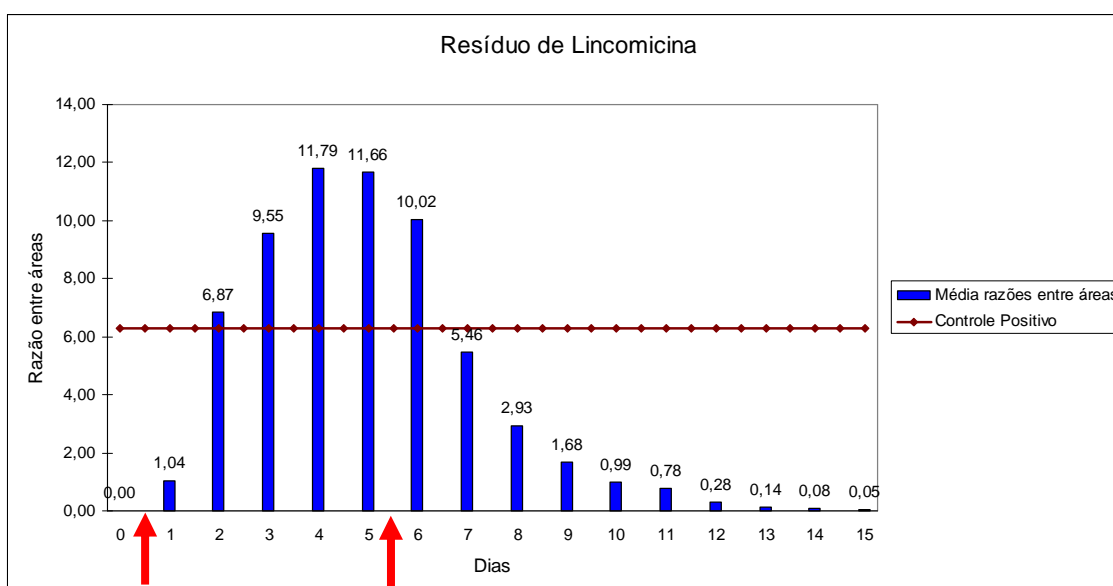


Gráfico 1 – Respostas das médias das repetições do tratamento 2 ao longo do período experimental.
Nota: as setas no gráfico sinalizam o início e o fim da medicação.

Os resultados indicaram a presença de resíduos de lincomicina a partir dos ovos coletados no dia 1 (um) do experimento, ou seja, em menos de 24 horas após o início do tratamento (ração com medicamento).

Prosseguindo com a análise dos resultados observou-se que, do dia 2 (dois) do experimento até o sexto dia, os valores médios encontrados (6,87; 9,55; 11,79; 11,66 e 10,02, respectivamente) foram

superiores ao valor do Controle Positivo (6,27) e, por isso, tais amostras seriam consideradas não conformes. Seriam, ainda, destinadas à análise por um método quantitativo, com o intuito de verificar a possível violação da amostra frente ao valor do LMR estabelecido na legislação para a lincomicina em ovos ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Os valores máximos das razões entre áreas foram observados no período final do tratamento (entre o quarto e quinto dia) e resíduos nas amostras ainda foram detectados até o último dia do período

experimental. Contudo, após o sexto dia, os valores encontrados são inferiores ao controle positivo e, conseqüentemente, ao limite máximo permitido para a lincomicina em ovos (amostras conforme).

Uma estimativa da concentração de lincomicina nas amostras é apresentada no gráf. 2. Essa estimativa foi calculada com base na concentração de fortificação do Controle Positivo e sua relação com a média da resposta obtida frente às médias das respostas das amostras.

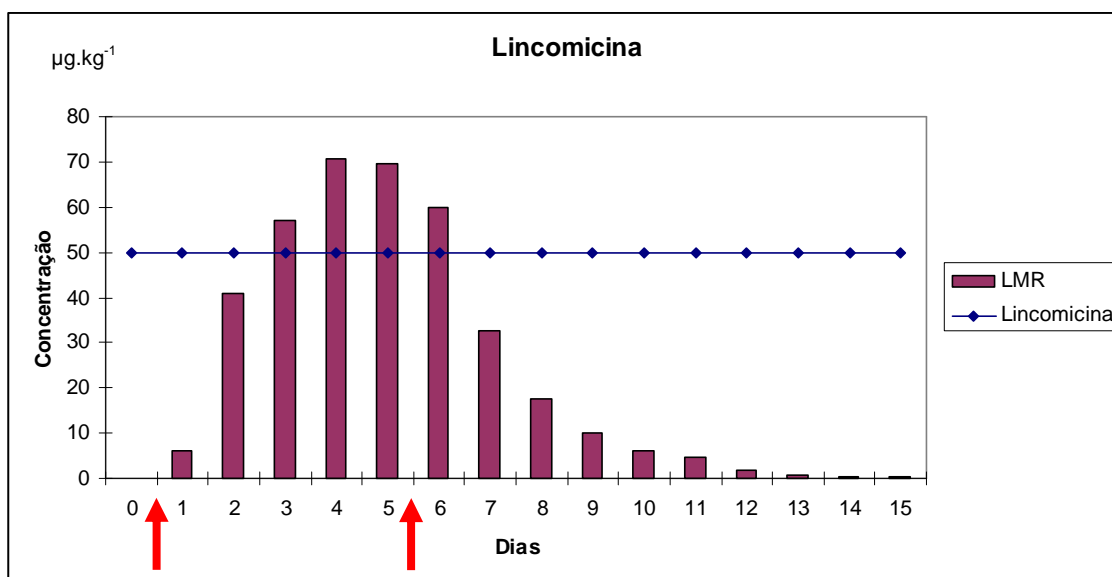


Gráfico 2 – Estimativa da concentração das amostras do tratamento 2 (lincomicina) obtidas no experimento “in vivo”, ao longo do período experimental.

Nota: as setas no gráfico sinalizam o início e o fim da medicação.

As lincosamidas são antimicrobianos de caráter básico, muito lipossolúveis, com alta afinidade por proteínas plasmáticas e, conseqüentemente, amplamente distribuídas (entre 1,0 e 1,4 L.kg⁻¹) (Spinosa, 2011a). Nos Estados Unidos é utilizada como promotor de crescimento e para controle de enterite necrótica causada por *Clostridium* sp. A associação da lincomicina com a espectinomicina é comercializada para uso oral em galinhas e recomendada para o controle da aerossaculite e Doenças Crônicas Respiratórias (Ito et al., 2005).

Um estudo com lincomicina marcada (¹⁴C) foi realizado em poedeiras. As aves receberam a medicação por meio de pílulas a cada 12 horas, durante 12 dias consecutivos. Os resultados obtidos variaram de 1,2 - 12,0 µg.kg⁻¹ durante o período de tratamento e de 1-4 µg.kg⁻¹, três dias após o tratamento. As concentrações encontradas na gema foram, aproximadamente, três vezes superiores aos da clara (EMEA, 2000).

Encontra-se, na literatura, uma série de informações sobre o período de carência da

lincomicina. Por outro lado, quando se trata de ovos, essas informações são praticamente inexistentes. Podem-se encontrar informações que consideram o uso seguro, sem a necessidade de carência para o consumo dos ovos, à informações que recomendam o não uso da lincomicina para aves de postura.

O medicamento utilizado neste experimento não apresentou informações e indicação para

uso em poedeiras e, conseqüentemente, não há determinação do período de carência.

Tratamentos 3 e 4 - Oxitetraciclina e Doxiciclina

Os resultados das médias das razões entre áreas das amostras dos tratamentos 3 (oxitetraciclina) e 4 (doxiciclina) estão apresentados nas tabs. 33 e 34.

Tabela 33 - Médias das razões entre áreas das amostras dos tratamentos 3 e 4 para todos os dias do período experimental

Dias	Médias	Coefficiente de Variação	Médias	Coefficiente de Variação
	Tratamento 3		Tratamento 4	
0	0,00	-	0	-
1	0,13	35,06	13,30	21,25
2	0,53	25,60	38,08	18,53
3	0,88	16,30	36,52	27,30
4	1,07	18,15	38,66	18,41
5	1,13	22,19	48,34	18,88
6	1,09	16,59	34,04	22,66
7	0,63	17,61	17,13	19,01
8	0,50	23,52	9,30	9,01
9	0,48	20,68	6,61	12,57
10	0,43	34,09	4,71	19,86
11	0,29	25,57	4,41	37,98
12	0,21	23,97	1,60	17,10
13	0,14	35,48	1,30	24,95
14	0,14	41,10	0,93	27,10
15	0,13	27,58	0,65	15,13

Os resultados médios apresentados para a oxitetraciclina possuem cinética semelhante aos resultados da doxiciclina, mas em valores bem inferiores de área o que, conseqüentemente, pode ser entendido como valores de concentração de resíduos no ovo inferiores aos encontrados para a doxiciclina.

Baixos valores de oxitetraciclina também foram encontrados por Donoghue e Hairston (1999) com o uso de uma concentração de 200 g.ton⁻¹, durante cinco dias. Os resíduos só foram observados no quinto e sexto dia

do experimento. Apesar dos baixos valores de razão entre áreas detectados neste trabalho foi possível verificar a presença da oxitetraciclina desde o dia 1 até o dia 15 do experimento, contudo, a concentração utilizada foi 2,75 vezes maior que a utilizada por Donoghue e Hairston (1999) o que poderia explicar essa diferença na cinética do analito.

Os cromatogramas gerados pela oxitetraciclina e doxiciclina estão apresentados na fig. 40.

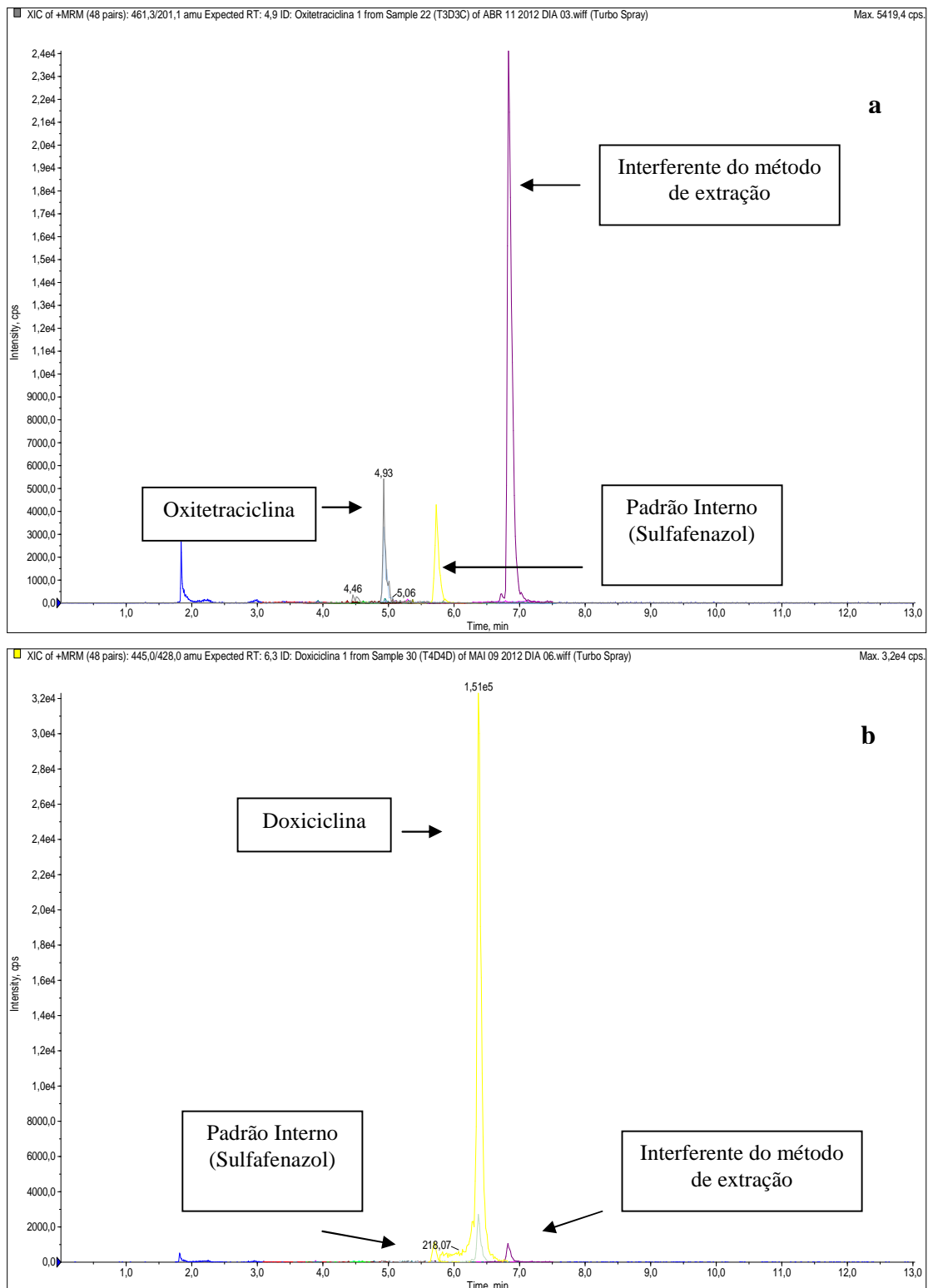


Figura 40 – Cromatogramas gerados pelas amostras do tratamento 3, dia 3, repetição C (a) e tratamento 4, no dia 4, repetição D (b).

A evolução do perfil de resíduos de ambas as tetraciclinas, analisadas em função dos

Controles Positivos fortificados em 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, está representada nos gráfs. 3 e 4.

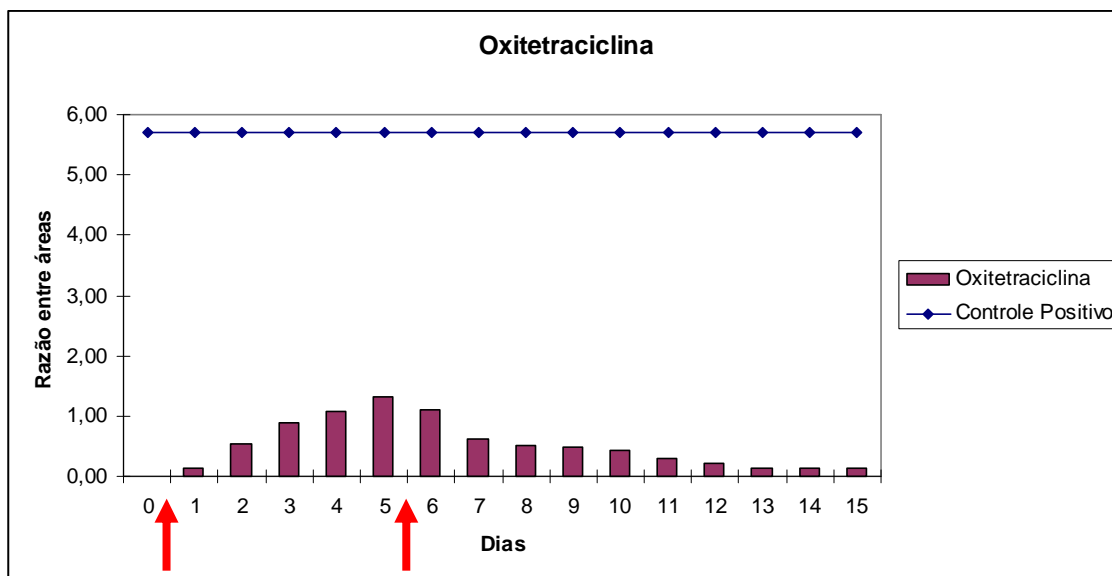


Gráfico 3 - Respostas das médias das repetições do tratamento 3 ao longo do período experimental. Nota: as setas no gráfico sinalizam o início e o fim da medicação.

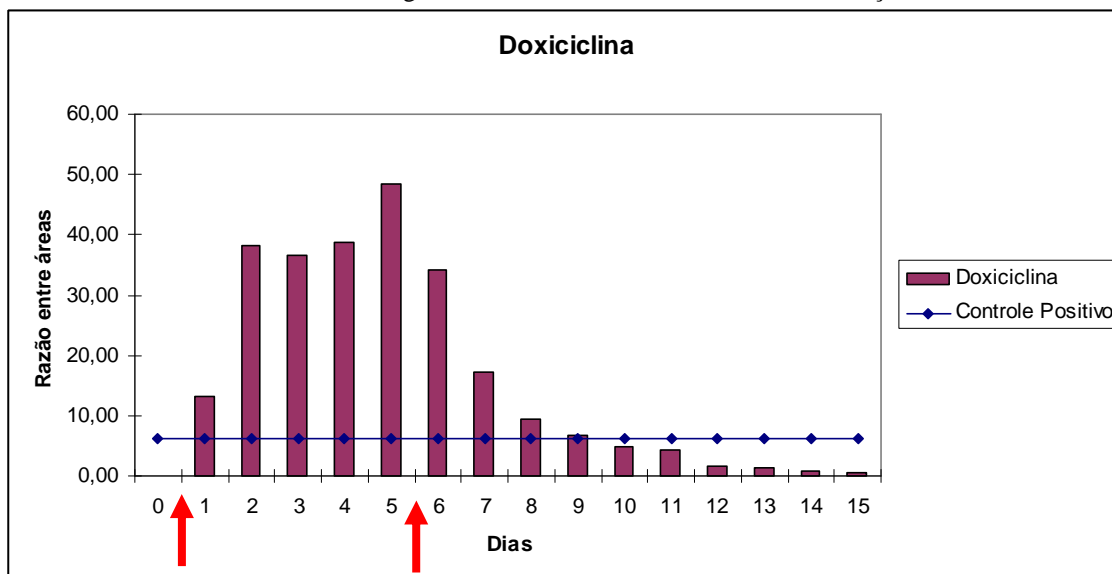


Gráfico 4 - Respostas das médias das repetições do tratamento 3 ao longo do período experimental. Nota: as setas no gráfico sinalizam o início e o fim da medicação.

Tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina possuem LMR estabelecido no *Codex Alimentarius* de 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, mas para a doxiciclina não há LMR e a indicação é a de não uso em galinhas poedeiras (*Codex Alimentarius Commission*, 2001). Pelos

resultados apresentados para a oxitetraciclina não há, em nenhum dia do período experimental, amostras não conformes, pois todas as médias das razões entre áreas, ao longo do período experimental, estão abaixo da faixa do

Controle Positivo (Graf. 3). Já para a doxiciclina foi possível observar que as razões ente áreas resultantes das amostras analisadas apresentaram resultado não conforme desde o dia 1 (um) do período experimental e se manteve dessa forma até o dia 9 (nove). A não conformidade das amostras está relacionada com o nível de validação (concentração alvo de triagem) utilizado para a doxiciclina, que foi o mesmo vigente para as demais tetraciclinas.

As tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos que podem ser administradas tanto por via oral, sendo absorvidas pelo trato digestivo, como por vias parenterais. Todos os antimicrobianos do grupo são muito bem absorvidos, contudo, a presença de alimentos no trato digestivo pode prejudicar a absorção das tetraciclinas, com exceção da minociclina e doxiciclina (Ito et al., 2005; Spinosa, 2011).

A absorção e distribuição das tetraciclinas podem variar com a lipossolubilidade das diferentes tetraciclinas. A oxitetraciclina é a menos lipofílica do grupo e, portanto, a que possui menor taxa de absorção após administração via oral. Já a doxiciclina, antimicrobiano sintético derivado da oxitetraciclina, é a mais lipofílica das tetraciclinas (5 a 10 vezes mais) atingindo uma biodisponibilidade elevada de 90 a 100% (Ito et al., 2005; Goetting et al., 2011, Spinosa, 2011).

As tetraciclinas, uma vez absorvidas, são distribuídas pelo organismo e se concentram no fígado e rins. São, também, depositadas nos ovos sendo detectadas primeiramente na clara, logo após a administração, mas atingem altos níveis de concentração na gema, persistindo por vários dias (Omija et al., 1994; Zurhelle et al., 2000). A deposição da doxiciclina em ovos atinge níveis bem mais altos do que os atingidos pela tetraciclina e esta, por sua vez, atinge níveis de concentração mais altos que a oxitetraciclina, quando utilizadas na mesma

dosagem e rota de administração (Goetting et al., 2011).

Trabalho com resultados semelhantes aos encontrados neste experimento foi desenvolvido por Yoshimura et al. em 1991. Poedeiras receberam doxiciclina e oxitetraciclina dissolvidas em água ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), durante sete dias consecutivos. Os ovos, colhidos diariamente, durante e após a medicação foram analisados por método microbiológico. As concentrações dos medicamentos aumentaram a cada dia, concomitantemente ao avanço da medicação. Apesar das semelhanças nas estruturas químicas das substâncias, a doxiciclina foi encontrada em concentrações mais elevadas, permanecendo por um período maior nos ovos, sendo encontrada quase um mês após o fim da medicação. Os autores concluíram que as variações na persistência dos resíduos nos ovos refletem as diferenças na absorção e na capacidade de penetração da substância nos tecidos.

O desaparecimento do resíduo depende dos níveis plasmáticos atingidos pelo medicamento. Quando os níveis plasmáticos da substância são rapidamente reduzidos do organismo os resíduos também desaparecem da clara em dois a três dias após o fim da exposição. Por outro lado, o desaparecimento na gema geralmente leva, aproximadamente, dez dias. As substâncias lipofílicas, absorvidas durante a fase de crescimento rápido da gema, já são detectadas nos ovos. No entanto, se o nível de exposição é muito alto e o limite de detecção para o fármaco testado muito baixo, os resíduos depositados nas gemas, que se encontram na fase intermédia de crescimento, também serão detectados (Omija et al., 1994; Kan & Petz, 2001). O mesmo foi concluído por Vandenberghe et al. (2012) que, mesmo utilizando baixas dosagens de doxicilina na ração (25 mg.kg^{-1}), detectaram resíduos de doxicilina até o dia 13 do experimento.

Neste experimento, não foi possível determinar até quando haveria resíduos nos ovos de ambas as tetraciclinas sendo necessário um período maior de dias de acompanhamento. Contudo, pela comparação dos valores de áreas encontrados para o analito com o valor do Controle Positivo não houve violação dos limites estabelecidos para a oxitetraciclina. Achado semelhante foi observado por Hintono et al. (2007) que encontraram resíduos de oxitetraciclina em ovos até sete dias após a interrupção da medicação, contudo, com valores abaixo do limite permitido.

Tratamento 5 - Enrofloxacin

A presença de resíduos de enrofloxacin foi pesquisada nos cromatogramas das amostras do tratamento 5. Picos cromatográficos no tempo de retenção esperado e a análise da presença das duas transições do analito possibilitaram confirmar a presença do resíduo nas amostras de ovos (fig. 41). Os resultados das 96 razões entre áreas das amostras do tratamento 5 estão apresentados na tab. 34.

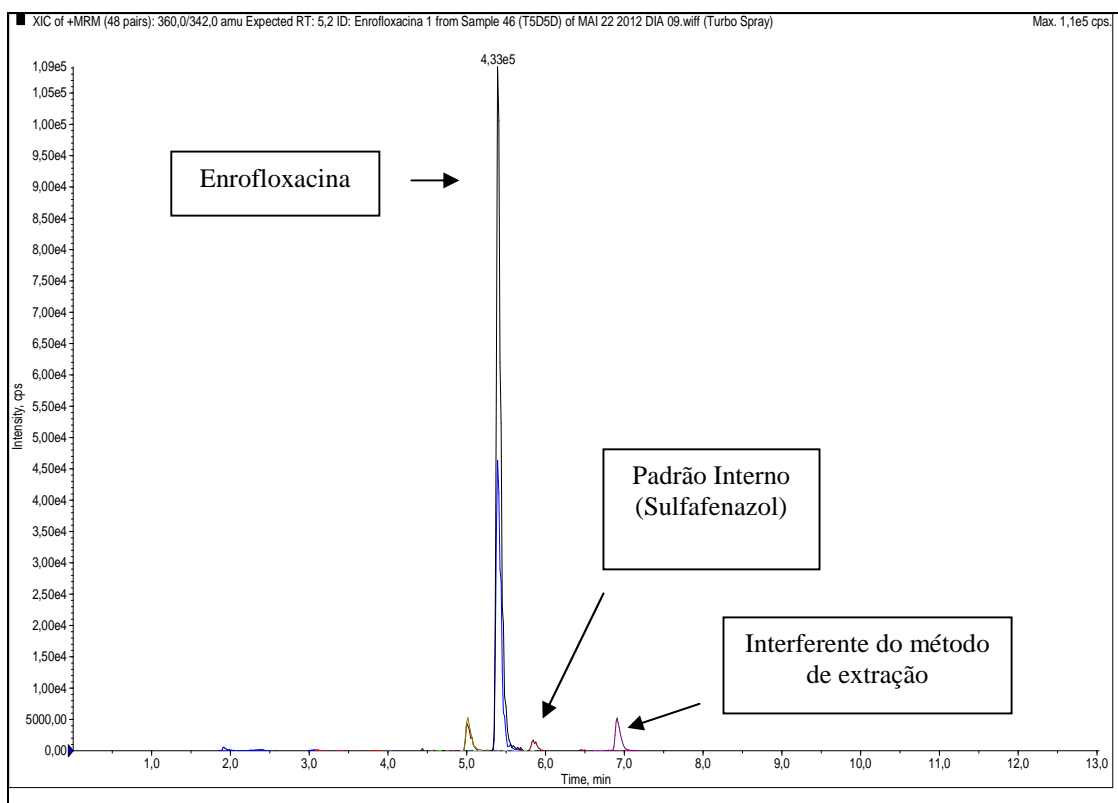


Figura 41 - Cromatograma gerado pela amostra do tratamento 5, dia 5, repetição D.

Tabela 34 - Médias de razão entre áreas das amostras do tratamento 5 para todos os dias do período experimental

Dias	Médias	Coefficiente de Variação
0	0,00	-
1	16,04	45,87
2	41,50	21,02
3	61,71	12,88
4	70,38	7,89
5	59,70	26,61
6	63,63	16,12
7	33,27	24,61
8	14,57	12,89
9	8,22	27,11
10	3,16	22,29
11	2,72	28,35
12	0,88	22,83
13	0,60	47,02
14	0,54	50,21
15	0,29	37,99

Os resultados obtidos demonstraram a presença de resíduos de enrofloxacina a partir do dia 1 (um) do experimento, ou seja, em menos de 24 horas após a disponibilização do medicamento, estendendo até o último dia do período experimental. Segundo Lolo et al., (2005) resíduos das fluoroquinolonas aparecem nos ovos dentro de 24 horas após a primeira dose e persistem por vários dias após o término do tratamento.

As quinolonas, antimicrobianos obtidos por síntese laboratorial, possuem amplo espectro de ação e possuem ampla aplicação tanto na medicina humana quanto na veterinária. Uma das principais vantagens do uso das fluoroquinolonas é sua ampla distribuição pelo organismo. Após a administração por via oral, as quinolonas são rapidamente absorvidas, contudo, o pico máximo de concentração varia conforme a espécie. Assim, por exemplo, após a administração oral de enrofloxacina, esta quinolona de segunda geração atinge o pico máximo de concentração sérica em 0,5; 0,9; 1,4; 2,5; 5,4 horas, em equinos, cães, perus, galinhas e bezerros (Górniak, 2011).

A enrofloxacina é uma piperanil fluorociclopropil quinolona estruturalmente

semelhante à ciprofloxacina, que é seu metabólito. No entanto, a farmacocinética da ciprofloxacina é diferente e sua biodisponibilidade é metade ou menos da metade no organismo da ave, quando comparada a enrofloxacina (Ito et al., 2005). O uso é proibido para animais de produção nos Estados Unidos (Goetting et al., 2011), e na União Europeia sua aplicação não é indicada para poedeiras (Comunidade Econômica Europeia, 2010). Contudo, pelo seu amplo espectro de ação, a enrofloxacina e seus análogos são recomendados para tratar galinhas e perus de infecções por *E. coli*, e *Pasteurella multocida*, coriza infecciosa das galinhas, infecções por *Ornithobacterium rhinotracheale*, celulite por Gram-negativos, estafilococose, salmoneloses, dentre outras infecções (Ito et al., 2005).

Na avaliação dos cromatogramas gerados (fig. 42) pelas amostras do tratamento 5 foi possível detectar a presença da ciprofloxacina. Pelo cromatograma, é possível comparar a resposta da enrofloxacina com a resposta analítica da ciprofloxacina e percebe-se que há uma diferença significativa na área gerada pelos analitos.

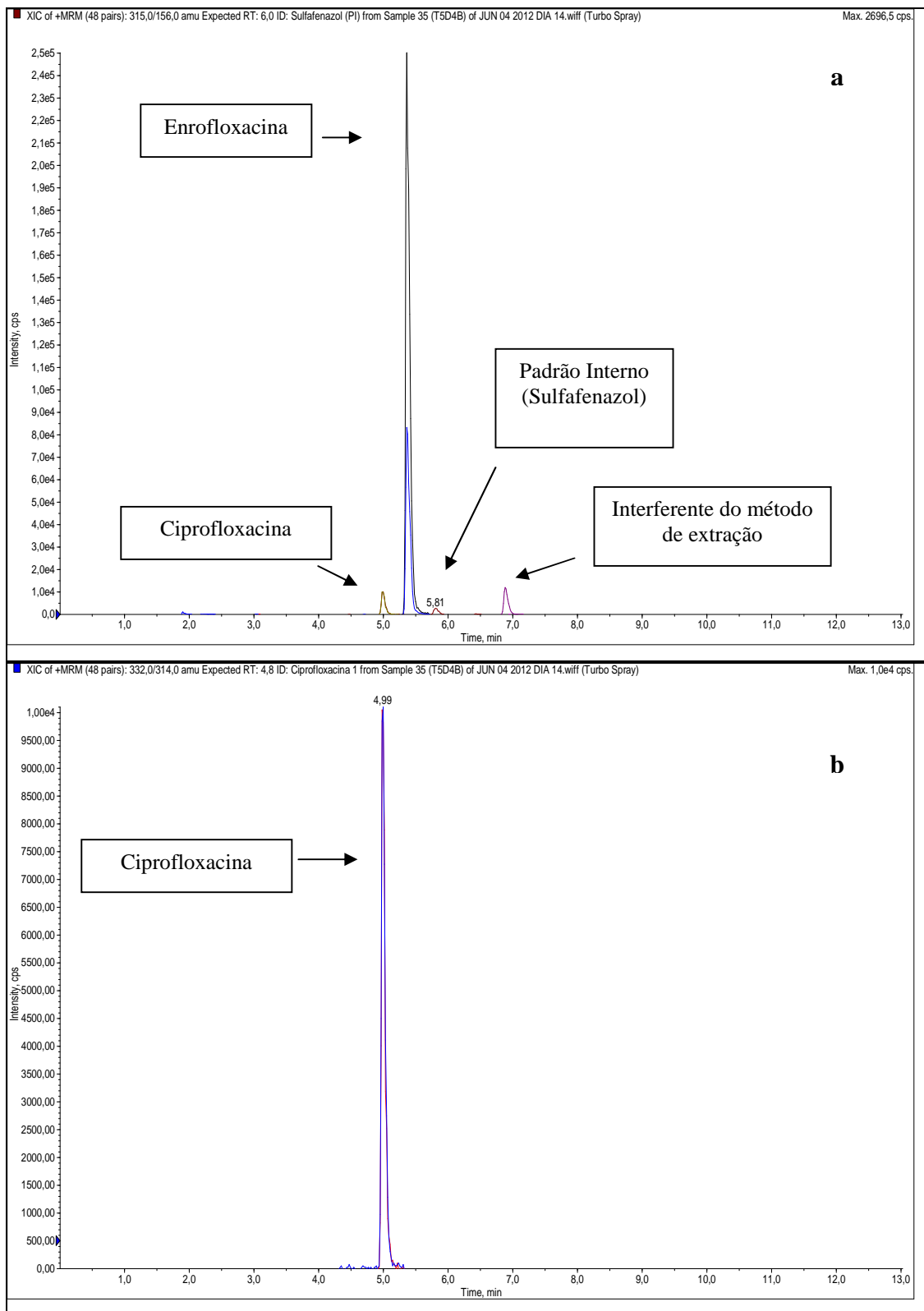


Figura 42 – Cromatograma gerado pela amostra do tratamento 5, dia 4 do período experimental, repetição B (a). Pico da primeira transição da ciprofloxacin (b).

Por se tratar, neste caso, de um metabólito da enrofloxacina a diferença entre os níveis de enrofloxacina e ciprofloxacina em ovos é esperada e, segundo Goetting et al., (2011) são encontradas na literatura variações que dependem da dose administrada e da via de administração utilizada.

A evolução do perfil de resíduos de ambas as fluoroquinolonas, analisadas em função do Controle Positivo fortificado em $7,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, está representada no gráf. 5.

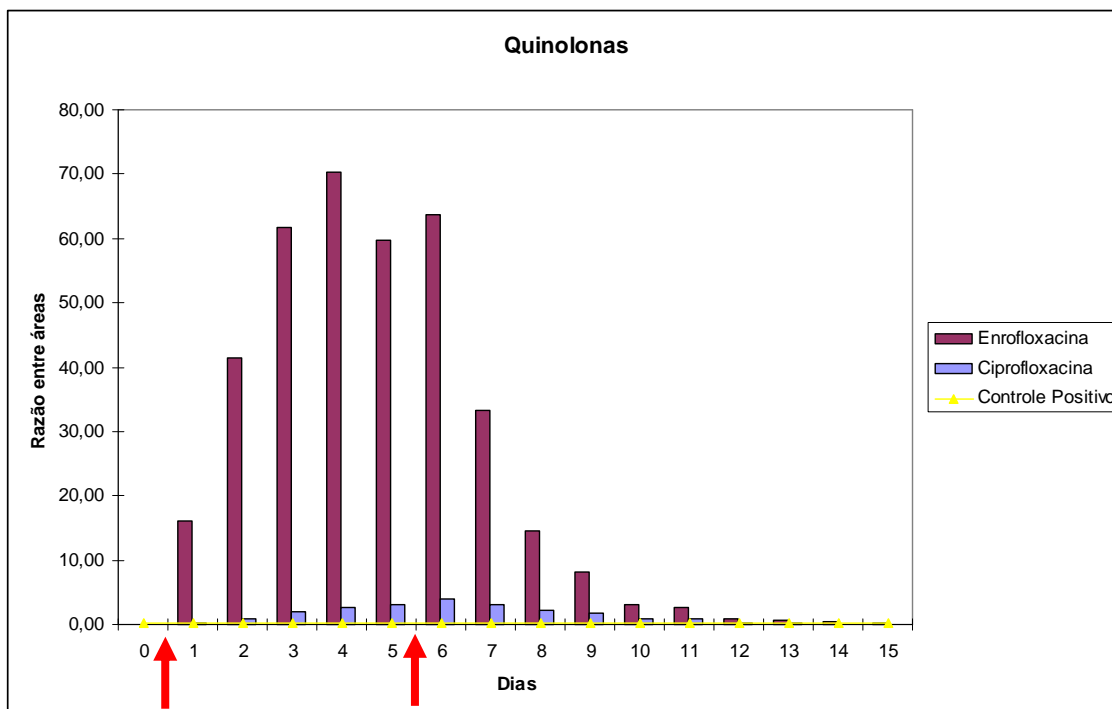


Gráfico 5 - Respostas das médias das repetições do tratamento 5 ao longo do período experimental.
Nota: as setas no gráfico sinalizam o início e o fim da medicação.

Analisando os resultados é possível observar que, para todos os dias do experimento, com exceção do dia zero, as médias (seis repetições) das respostas das razões entre as áreas da enrofloxacina pela área do padrão interno estão acima da média da razão entre áreas do controle positivo. De acordo com o método validado e utilizado para a análise, as respostas do dia 1 ao dia 15 do período experimental são não conformes e, por isso, seria necessário quantificá-las.

Considerando que, o PNCRC de 2012 estabelece como LMR o valor de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para enrofloxacina deve-se analisar o período de carência para essa substância

quando do seu uso em poedeiras, pois após a interrupção do seu uso no experimento foi possível detectá-la por mais dez dias.

As respostas analíticas da enrofloxacina, em todos os dias do experimento, foram maiores que as da ciprofloxacina (gráfico 6). Tais resultados estão de acordo com os achados de Gorla et al. (1997) e Lolo et al., (2005) que detectaram o metabólito em níveis inferiores nos ovos de galinhas tratadas com enrofloxacina. Contudo, a curva de depleção do resíduo da enrofloxacina é mais rápida se comparada com a de seu metabólito, que apresenta um taxa de depleção mais suave.

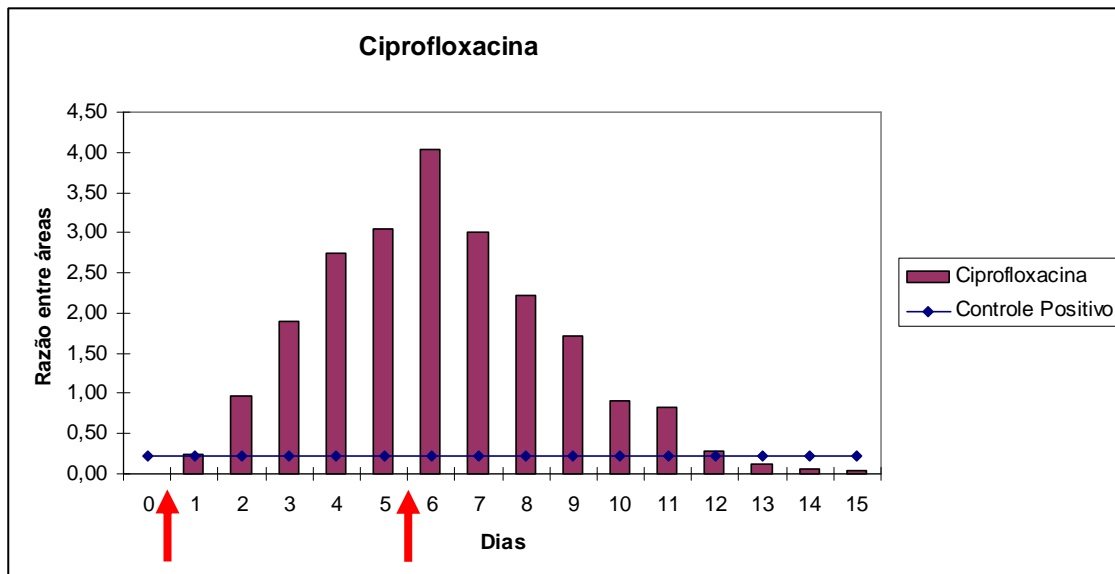


Gráfico 6 - Respostas das médias das repetições das amostras do tratamento 5 para o analito ciprofloxacina ao longo do período experimental.

Nota: as setas no gráfico sinalizam o início e o fim da medicação.

Lolo et al. (2005) observaram a mesma característica para o metabólito da enrofloxacin. Após a administração da última dose do tratamento, a curva de enrofloxacin caiu rapidamente, enquanto que o metabólito ciprofloxacina permaneceu por vários dias na gema. O nível máximo foi atingido no sétimo dia. Para os autores o metabolismo da enrofloxacin pode ser a explicação para o achado. O fígado é o órgão no qual ocorre a metabolização da enrofloxacin e também o órgão que produz lipoproteínas (os constituintes principais da gema). Dessa forma, é possível compreender o maior nível de resíduo da ciprofloxacina encontrado na gema e a sua persistência por

mais tempo nos níveis próximos do valor máximo, antes de diminuir.

Os resultados das análises demonstraram que as amostras do dia 1 (um) ao dia 12 do período experimental apresentaram resultados acima do Controle Positivo e, conseqüentemente, são consideradas como não conforme. Na rotina de análises do laboratório, tais amostras seriam direcionadas para um método quantitativo com o intuito de verificar se houve ou não violação do Limite Máximo de Resíduos, que é de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para a ciprofloxacina (PNCRC, 2012).

5. Conclusões

O acompanhamento do perfil de resíduos nos ovos, produzidos durante e após o uso por cinco dias de neomicina, lincomicina, oxitetraciclina, doxiciclina e enrofloxacin adicionados na ração nas concentrações recomendadas pela bula dos medicamentos, por meio do método multirresíduos por CL-EM/EM validado (Capítulo 2) permitiu concluir que:

- Todos os princípios ativos utilizados (lincomicina, oxitetraciclina, doxiciclina e enrofloxacin) são capazes de gerar resíduos em ovos, com exceção da neomicina.
- A concentração do resíduo de lincomicina, provavelmente, viola o Limite Residual Máximo estabelecido.
- Resíduo de oxitetraciclina não ultrapassa o Limite Máximo de Resíduos estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.
- A doxiciclina, não indicada para uso em galinhas poedeiras pelo *Codex Alimentarius*, gera resíduos durante todo o período de tratamento e por, pelo menos, 10 dias após a suspensão do uso.
- A enrofloxacin e seu metabólito (ciprofloxacina) geram resíduos em ovos e, provavelmente, os valores encontrados ultrapassam o Limite Máximo de Resíduos estabelecido para ambos os analitos, segundo o PNCRC de 2012.

3. Referências Bibliográficas

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *NBR ISSO 22000: Sistemas de gestão da segurança de alimentos – Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos*. Rio de Janeiro: ABNT; 2006.

ALM EL DEIN, A.K.; ELHEARON E.R. Antibiotic residue in eggs of laying hens following injection with gentamicin. *New York Science Journal*, v.11, n.3, 2010.

ALMEIDA, M. P. *Validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório para determinação de multirresíduos de β -lactâmicos e tetraciclina em rim de ave, bovino, equino e suíno por CLUE-EM/EM*. 2011. 78f. Dissertação em Ciência Animal, Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*. Resolução RE N.º 899, de 29 de maio de 2003.

Australian Pesticides & Veterinary Medicine Authority. The Reconsideration of Registrations of Products Containing Neomycin (Oral, Intramammary and Injectable Preparations) and Their Associated Approved Labels. Manager Chemical Review. 2007. Disponível em: <http://www.apvma.gov.au/products/review/docs/neomycin_scope.pdf> Acesso em maio de 2012.

BLANCHFLOWER W. J., MCCRACKEN, R. J., HAGGAN, A. S., KENNEDY, D. G. Confirmatory assay for determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.692, p.351-360, 1997.

BOGIALLI S.; CAPITOLINO V.; CURINI R.; et al Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues

and milk. *J. Agric. Food Chem.* V.52, n.11, p.3286-91, 2004.

BOGIALLI, S., CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Analical Bioanalytical Chemistry*, v.395, p.947-966, 2009.

BONDI, M. C., MARAZUELA, M. D., HERRANZ, S., RODRIGUEZ, E. An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Analical Bioanalytical Chemistry*, v.395, p.921-946, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da União*, de 22 de dezembro de 1999, Seção 1, Página 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 24, de 14 de julho de 2009. Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes – PNCRC Animal. *Diário Oficial da União*, N.º 138, de 22 de julho de 2009 – Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N.º 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial da União*, de 10 de julho de 2009 – Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 07, de 04 de abril de 2012. Publica os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos

subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, de Aves e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2011, na forma dos Anexos a presente Instrução Normativa. Diário Oficial da União, de 05 de abril de 2012 – Seção 1.b

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 24, de 9 de agosto de 2011. Subprograma de Monitoramento em carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2011, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal PNCRB, instituído pela Portaria MAPA N.º 51, de 6 de fevereiro de 1986, na forma do Anexo I à presente Instrução Normativa. *Diário Oficial da União*, 11 de agosto de 2011 – Seção 1ª.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 9, de 27 de junho de 2003. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da União, de 30 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de coleta do PNCRB – MAPA / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 48 p, 2011.b

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N.º 51, de 6 de fevereiro de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Diário Oficial da União, de 07 de fevereiro de 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 11, de 22 de maio de 2012. Subprograma

de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz para o exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, na forma dos Anexos I e II à presente Instrução Normativa. *Diário Oficial da União*, 25 de maio de 2012 – Seção 1.a

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. Atualizado em 03/12/2008 – Divisão de Aditivos/CPAA/DFIP/SDA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados>> Acesso em abril de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. 1990. Portaria N.º 1, de 21 de fevereiro de 1990. Aprovar as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados, propostas pela Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados – DICAR. *Diário Oficial da União*, de 06 de março de 1990, Seção 1, Página 4321.

CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégias e validação*. São Carlos: Ed Edufscar, 2001. 77p.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. CAC/MRL 2-2009. Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários en los Alimentos. Actualizado en el 32ª Sesión de el Comisión del *Codex Alimentarius Commission*, Julho de 2009. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_s_2009.pdf> Acesso em: abril de 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. CAC/MRL 2-2011. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 34th Session of the *Codex Alimentarius Commission*. Julho, 2011. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/>

- [data/MRL2_e_2011.pdf](#) Acesso em setembro de 2011.
- COMPANYÓ, R., GRANADOS, M., GUITERAS, J., PRAT, M. D. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods. *Analical Bioanalytical Chemistry*, v.395, p.877-891, 2009.
- CUNHA, M. R. R. *Análise de multirresíduos de antibióticos anfenicóis e β-lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas*. 2009. 172p. Tese em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP: [s.n.], 2009.
- DE LA CRUZ, M. N. S.; SOARES, R. F., MARQUES, A. S. F. et L. Development and Validation of Analytical Method for Sulfonamide Residues in Eggs by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry based on the Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of the Brazilian Chemical Society.*, v.22, n.3, p.454-461, 2011.
- DONATO, D. C. Z.; GANDRA, E. R. S.; GARCIA, P. D. S. R. A questão da qualidade no sistema agroindustrial do ovo. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre, 26 a 30 de julho de 2009. Disponível em: www.sober.org.br/palestra/13/439.pdf Acesso em: novembro/ 2011.
- DONOGHUE, D. J.; HAIRSTON, H.; GAINES, S. A.; et al. Modeling residue uptake by eggs: I. Similar drug residue patterns in developing yolks following injection with ampicillin or oxytetracycline. *Poultry Science*, v.75, p. 321-328, 1996.
- DONOGHUE, D.J. Investigating Drug Transfer into Eggs. FDA Veterinarian Newsletter, v.13, n.1, 1998. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm088949.htm>> Acesso em: maio de 2012.
- DONOGHUE, D.J.; HAIRSTON H. Food Safety Implication: Certain Antibiotics May Rapidly Contaminate Egg Albumen during the Process of its Formation. *British Poultry Science*, v.41, p.174-177, 2000.
- DONOGHUE, D. J.; MYERS K. Imaging Residue Transfer into Egg Yolks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.6428-6430, 2000.
- DOYLE, M. E. *Veterinary Drug Residues in Processed Meats – Potential Health Risk (A Review of the Scientific Literature)*. 2006. Disponível em: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_VetDrugRes.pdf>. Acesso em abril/2010.
- EMEA. European Medicines Agency *Veterinary Medicines and Inspection. Committee for Veterinary Medicinal Products*. Lincomycin. Summary Report (2). EMEA/MRL/749/00-FINAL-corr, 2000.
- EUROPEAN COMMISSION, 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm/>. Acesso em janeiro/2012.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Communities*, Brussels, 2002, L 221, p. 0008 – 0036.
- EUROPEAN COMMISSION. Regulamento (CEE) nº 37/2010 – REGULAMENTO (UE) Nº. 37/2010 DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.
- FAGERQUIST, C. K., LIGHTFIELD, A. L., LEHOTAY, S. J. Confirmatory and quantitative analysis of β-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 77, p. 1473-1482, 2005.

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. *Agribusiness Handbook: Poultry Meat & Eggs*. Investment Centre Division. Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italy.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Office of Research 2000 Righlights. Veterinarian Newsletter, v. 16, n. 3, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDAVeterinarianNewsletter/ucm130387.htm>> Acesso em: março/2012.
- GAUGAIN-JUHEL, M.; DELEPINE, B.; GAUTIER, S.; et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Additives and Contaminants Part A.*, n. 26 p. 1459-1471, 2009.
- GAUGAIN-JUHEL, M.; HURTAUD-PESSEL, D.; SOPHIE, G. Method for the screening of antibiotics residues in muscle and milk by LC/MS-MS. LMV/RMV/SM/PTC/04.AN. *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*. Versão 3, de 08 de abril de 2010. Documento interno.
- GOETTING, V.; LEE, K. A.; TELL, L. A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 34, n. 6, p. 521-556, 2011.
- GÓRNIAK, S.L. Sulfas, quinolonas e outros quimioterápicos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 409-441.
- GUERRERA, I., KLEINER, O. A. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience reports*, v. 25, n.1/2, 2005.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 3, n. 3, p.667-679, 2010.
- HAMMEL, Y., MOHAMED, R., GREMAUD, E., LE-BRETON, M., GUY, P. A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1177, p. 58-76, 2008.
- HINTONO, M.A.; ASTUTI, M.; WURYASTUTI, H.; et al. Oxytetracycline Residues and Their Antibacterial Activity in Eggs Laid by Hens Administered by Therapeutic Dose of Oxytetracycline via Drinking Water. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, v. 32, n. 1, p. 64-70, 2007.
- HOFF, R. *Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas*. 2008. 134p. Dissertação em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2008.
- HOLTHOOM, F., MULDER, P. P. J., BENNEKOM, E. O., HESCAMP, H., ZUIDEMA, T., RHIJN, H. J. A. Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.396, p. 3027-3040, 2010. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, Revisão 04 – Julho. 2011.
- ITO, N.M.K.; MYIYAJI, C.I.; LIMA, E.A. et al. Antimicrobianos: Usos preventivos e curativos em avicultura. In: Palermo-Neto, J., Spinosa, HS. & Górnaiak, SL.: *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. Editora: Roca, São Paulo, p. 115-147, 2005.
- KAN, C. A. Residues of veterinary drugs in eggs and possible explanations for their distribution between egg white and yolk. 80f. Dissertação, Holanda, 2003.

- KAN, C. A.; PETZ, M. Detecting residues of veterinary drugs in eggs. *World Poultry*, v. 17, n. 2, p. 16-17, 2001.
- KINSELLA, B., O'MAHONY, MALONE, E., MALONEY, M., CANTWELL, H., FUREY, A., DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.
- KOOLS, S. A. E., MOLTMANN, J. F., KNACKER, T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, v. 50, p. 59-65, 2008.
- LOLO, M.; PEDREIRA, S.; FENTE, C.; et al. Study of Enrofloxacin Depletion in the Eggs of Laying Hens Using Diphasic Dialysis Extraction/Purification and Determinative HPLC-MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2849-2852, 2005.
- MACHINSKI JUNIOR, M.; BENINI, A.; NETTO, D. P. Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná. PAMvet-PR / 2005. Disponível em: <www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/.../relatorio%20avicultra.pdf> Acesso em: março/2011.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, *Jornal de Microbiologia de Brock*. 10ª Edição. São Paulo: Editora Prentice Hall, 2004, 608 p.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S.F.; O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal – PNCRC/animal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. Acesso em: Novembro/2011.
- MITCHEL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; MCEWEN, S. A.; MCNAB, W. B.; YEE, A. J. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 6, p.742-756, 1998.
- MOREIRA, R. P. L. *Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM*. 2012. 161f. Tese em Ciências-Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2012.
- OMIJA, B.; MITEMA, E.S.; MAITHO, T.E. Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens. *Food Additives and Contaminants*, v. 11, n. 6, p. 641-647, 1994.
- PALERMO-NETO, J. Considerações gerais sobre o uso de agentes que alteram a produção animal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 561-570.
- PALERMO-NETO, J.; ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.
- PASCHOAL, R. J. A., RATH, S., AIROLD, F. P. S., REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, v. 31 n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- PIKKEMAAT, M. G.; MULDER, P. P. J.; ELFERINK, J. W. A.; et al. Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Additives and Contaminants*, August, v. 24, n.8, p. 842–850, 2007.
- PINTO, M. M. G. M. *Segurança Alimentar – Resíduos químicos ovo alimento seguro?* 2011. 67f. Dissertação em Segurança Alimentar – Faculdade de Medicina

- Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- POSYNIAK, A., MITROWSKA, K., ZMUDZKI, J., NIEDZIELSKA, J. Analytical procedure for determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys. *Journal of Chromatography A*, v. 1088, p. 169-174, 2005.
- POUCKE, C. V.; KEYSER, K. D.; BALTUSNIKIENE, A.; et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Analytica Chimica Acta*, v. 483, p. 99-109, 2003.
- PULIDO, A.; RUISÁNCHEZ, I.; BOQUÉ, R.; RIUS F.X. Estimating the uncertainty of binary test results to assess their compliance with regulatory limits. *Analytica Chimica Acta*, v. 455, p. 267-275, 2002.
- RIEDIKER, S., RYTZ, A., STADLER, R. H. Cold-temperature stability of five β -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, p. 359-363, 2004.
- ROSÁRIO, T.R. Resíduos de Medicamentos em Carne de Frango e Ovos. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L. *Farmacologia Aplicada à Avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos*. São Paulo: Roca, 2005. p. 287-302.
- ROUDAUT, B. Residues of aminoglycoside antibiotics in eggs after medication of laying hens. *British Poultry Science.*, v. 30, n. 2, p. 265-71, 1989.
- ROUDAUT, B.; MORETAIN, J.P.; BOISSEAU, J. Excretion of oxytetracycline in eggs after medication of laying hens. *Food Additives and Contaminants*, v. 4, n. 3, p. 297-307, 1987.
- SANTANA, E. S.; OLIVEIRA, F. H.; BARNABÉ, A. C. S. et al. *Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura*. Centro Científico Conhecer. Disponível em: <
<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/uso%20de%20antibioticos.pdf>>
 Acesso em: abril/2011.
- SANTOS, I. C. A.; SOUSA, R. V.; SANTANA, G. C. *Princípios da antibioticoterapia em medicina veterinária*. Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras 38, 5-42, 2001. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_38.pdf> Acesso em: Dezembro/2011.
- SCHNEIDER, M. J.; DONOGHUE, D. J. Multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in eggs using liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 483, p. 39-49, 2003.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRIL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5 ed. Rio de Janeiro: 1994. 387p.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos bacteriostáticos que interferem na síntese protéica: macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas, estreptograminas, tetraciclina, cloranfenicol e derivados. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 464-473.a
- SPINOSA, H.S. Antibióticos que interferem na síntese da parede celular: Betalactâmicos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 442-449.c
- SPINOSA, H.S. Antibióticos que interferem na síntese de ácidos nucleicos (rifamicinas e novobiocina) e antibióticos bactericidas que interferem na síntese protéica (aminoglicosídeos). In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 456-463.b
- SPINOSA, H.S.; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I. et L. Antimicrobianos: Considerações Gerais. In: PALERMO-NETO, J.;

- SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. *Farmacologia Aplicada à Avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos*. São Paulo: Roca, 2005. p. 87-104.
- SPINOSA, H.S.; TÁRRAGA, K.M. Considerações Gerais sobre os Antimicrobianos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 409-441.
- SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e Contaminantes Químicos em Alimentos de Origem Animal no Brasil: Histórico, Legislação e Atuação da Vigilância Sanitária e Demais Sistemas Regulatórios. *Rev. Ciência Saúde Coletiva*, v. 14, n. 6, p.2091-2106, 2009.
- SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; et al. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. *Food Additives and Contaminants B*, v. 3, n. 4, p. 212–219, 2010b.
- STOLKER, A. A. M., ZUIDEMA, T., NIELEN, M. W. F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 10, 2007.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10ª Ed. Porto Alegre. Artes Médicas Sul, 2005. 827 p.
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 2, 2004
- VANDENBERGE, V.; DELEZIE, E.; HUYGHEBAERT, G.; et al. Residues of sulfadiazine and doxycycline in egg matrices due to cross-contamination in the feed of laying hens and the possible correlation with physicochemical, pharmacokinetic and physiological parameters. *Food Additives and Contaminants: Part A*, v. 29, n. 6, p. 908 – 917, 2012.
- WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.
- YOSHIMURA, H., OSAWA, N., RASA, F.S.; et L. Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hens. *Food Additives and Contaminants*, v. 8, n. 1, p. 65-69, 1991.

4. Apêndice

Unidades de medidas

µg - micrograma
µg.kg⁻¹ – micrograma por quilo
µg.mL⁻¹ – micrograma por mililitro
µL – microlitro
µL – microlitro
µm – micrometro
mol.L⁻¹ – mol por litro
mL - mililitro
mm – milímetro

Abreviaturas e Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN – Acetonitrila
AFFSA - *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI - Ionização química a pressão atmosférica
APPI - Fotoionização a pressão atmosférica
CAD - gás de colisão
CCAB - Comitê do Codex Alimentarius do Brasil
CCRC - Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes
CE – Comunidade Europeia
CEE – Comunidade Económica Europeia
CID - Dissociação Induzida por Colisão
CL – Cromatografia Líquida
CLAE/EM - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COMISA - Consultation Mondiale de Industrie de La Santé Animale
CONMETRO - Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
CP – Controle Positivo
CUR - gás de dessolvatação
Cval- Concentração da validação

CXP - potencial de saída da célula de colisão
DP - Potencial de Desagregação (*Potential Declustering*)
EC - Energia de Colisão (*Collision Energy*)
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EM – Espectrometria de Massas
EMEA - European Agency for the Evaluation of Medical Products
EP - potencial de entrada
ESI - Electrospray
FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
F_c – Fator de Corte
FDA - Food and Drug Administration
FEDESA - Federação Europeia de Saúde Animal
GS1 - gás nebulizante
GS2 - gás secante aquecido
HFBA – Ácido Heptafluorobutírico
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA's - Ingestões Diárias Aceitáveis
IN – Instrução Normativa
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental
LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário
LD - limite de detecção
LMDR – Limite Máximo de Desempenho Requerido
LMR (´s) – Limite (s) Máximo (s) de Resíduo (s)
LRM - Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários
MALDI - Ionização de matriz assistida por laser
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL – Mercado Comum do Sul
MRM – *Multiple Reaction Monitoring* (Monitoração de Reações Múltiplas)
°C – graus Celsius
OMS - Organização Mundial da Saúde
PABA - ácido para-aminobenzóico
PAMvet – PR - Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos

Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PAMvet - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos

PI – Padrão Interno

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal

PTFE – Politetrafluoretileno

Q1 - Primeiro Quadrupolo

Q3 - Terceiro Quadrupolo

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal

TCA – Ácido Tricloroacético

T_{valor} - *Threshold Value* (valor de T)

UBABEF - União Brasileira de Avicultura

UV – Ultravioleta

XIC – Extracted Ion Chromatogram