

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

MARIA DE FÁTIMA GOMIDES

**RESÍDUOS DE TETRACICLINAS,
AMINOGLICOSÍDEOS E FLUOROQUINOLANAS EM
LEITE POR CLAE-EM/EM**

Belo Horizonte, MG

2015

MARIA DE FÁTIMA GOMIDES

**RESÍDUOS DE TETRACICLINAS,
AMINOGLICOSÍDEOS E FLUOROQUINOLANAS EM
LEITE POR CLAE-EM/EM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciências de Alimentos

Orientador: Prof.^a Maria Beatriz Abreu Glória

Belo Horizonte, MG

2015

G633r Gomides, Maria de Fátima.
Resíduos de tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em leite
por CLAE-EM/EM / Maria de Fátima Gomides. – 2015.
107 f. : il.

Orientadora: Maria Beatriz Abreu Glória.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Antibióticos – Teses. 2. Leite – Teses. 3.
Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Glória,
Maria Beatriz Abreu. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

MARIA DE FÁTIMA GOMIDES

RESÍDUOS DE TETRACICLINAS, AMINOGLICOSÍDEOS E
FLUOROQUINOLONAS EM LEITE POR CLAE/EM-EM

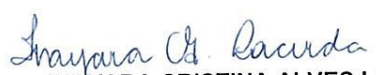
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31 DE JULHO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ANDRÉA DE MELO GARCIA OLIVEIRA


Prof. Dr. LEORGES MORAES DA FONSECA


Profa. Dra. MARIEM RODRIGUES RIBEIRO DA CUNHA


Profa. Dra. INAYARA CRISTINA ALVES LACERDA
Presidente da Comissão


Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA
Orientadora

Dedico este trabalho a Deus
em primeiro lugar, a meus
pais, irmãos e sobrinhos,
pois vocês são a razão do
meu viver.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela vida, sem a qual não teria forças para continuar caminhando e acreditando, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais Adyler e Zenita por todo incentivo, amor e dedicação.

Aos meus irmãos Dirce, Ângela, Claudiney, Denilson e toda minha família, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional, e também pelas orações que sempre me fortaleceram.

À Cristo, Ramatis e Ramal, pelo apoio e assistência ao longo de toda a minha caminhada.

A minha colega e amiga Valeria pelo apoio e carinho nos piores momentos.

A Tânia Mara Amâncio Guerra Peixoto, chefe do Serviço de Química pela confiança e oportunidade no uso dos Laboratórios de Resíduos de Pesticidas e de Análises de Microcomponentes para a realização das análises.

A Professora Maria Beatriz de Abreu Gloria, pela oportunidade de trabalhar com uma pessoa que é um exemplo de gentileza, profissionalismo e humanidade, por acreditar em mim mesmo nos tempos difíceis aos quais passei.

À Dra Mariem Rodrigues Ribeiro Cunha, pesquisadora, pelo seu conhecimento, apoio e incentivo ao longo de todo o trabalho.

À Fátima, Flávia, Francisneide, Giancarlo, Larissa, Lívia, Lorena, Renata e Shirley pelo apoio na execução das análises.

Aos técnicos e colegas de trabalho da Fundação Ezequiel Dias, pelo carinho e amizade.

À Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental, Serviço de Química, Laboratório de Análise de Microcomponentes (FUNED/IOM/DIVISA/SQ/LAM), pelo suporte humano, material e financeiro, imprescindível à realização das análises.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos funcionários da biblioteca, da secretária do Departamento de Alimentos e da secretaria do PPGCA da FARFAR/UFMG pelo incentivo e pela atenção especial.

Aos membros da comissão examinadora, pela disponibilidade e contribuição.

A vida é uma pequena partícula que Deus nos deu. Ao trabalharmos na busca incessante de alimentos ou produtos de melhor qualidade, preservamos essa pequena partícula divina que Deus nos ofertou.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	06
LISTA DE TABELAS	08
LISTA DE FIGURAS	09
ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DA LITERATURA	16
1. ANTIBIÓTICOS	16
1.1. Tetraciclinas	18
1.2. Aminoglicosídeos	20
1.3. Fluoroquinolonas	20
2. OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE	21
3. MÉTODOS DE ANÁLISES DE ANTIBIÓTICOS	23
3.1. Métodos de triagem	23
3.2. Métodos cromatográficos	24
3.2.1. Métodos para clean-up e extração	24
3.2.2. Métodos de análise	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
1. MATERIAL	28
1.1. Amostras	28
1.2. Reagentes, materiais diversos e padrões de antibióticos	29
1.3. Vidrarias	29
1.4. Equipamentos	30
2. MÉTODOS	30
2.1. Preparo das soluções	30
2.1.1. Soluções padrão estoque e intermediárias utilizadas no CLAE-EM/EM	30
2.1.2. Soluções padrão estoque e intermediárias utilizadas no kit tetraciclinas	31
2.1.3. Outras soluções	32
2.2. Análise qualitativa de tetraciclinas em leite	33
2.2.1. Preparo da amostra de leite controle para análise no kit SNAP	33
2.2.2. Confirmação do limite de detecção do kit SNAP	33
2.2.3. Análise das amostras de leite pelo kit SNAP tetraciclinas	33
2.3. Análise quantitativa de aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas por CLAE-EM/EM	34
2.3.1. Preparo das amostras de leite para análise	34
2.3.2. Otimização da análise no espectrômetro de massas	34
2.3.3. Otimização das condições no CLAE	35
2.3.4. Extração de antibióticos das amostras	35

2.3.5. Validação do método analítico no CLAE-EM/EM.....	35
2.3.6. Análise de antibióticos em leite por CLAE-EM/EM	38
2.4. Análise estatística	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1. TRIAGEM DE AMOSTRAS DE LEITE DE MINAS GERAIS NO KIT SNAP PARA TETRACICLINAS	39
2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CLAE-EM/EM.....	40
3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CLAE-EM/EM	43
3.1. Seletividade	44
3.2. Linearidade.....	45
3.3. Efeito matriz.....	50
3.4. Precisão e exatidão.....	53
3.5. Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método	55
3.6. Limites de decisão ($CC\alpha$) e de capacidade de detecção ($CC\beta$) do método.....	56
4. OCORRÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS DE LEITE	56
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE A – Espectro de Massas, Scam dos Produtos Ótimos e Perfil Cromatográfico dos Padrões de Antibióticos	77
APÊNDICE B – Tabelas de Avaliação dos Parâmetros de Linearidade da Padronização Externa e Interna dos Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas e Tetraciclinas	94
APÊNDICE C – Tabelas de Avaliação dos Parâmetros de Efeito Matriz da Padronização Externa e Interna dos Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas e Tetraciclinas	99
APÊNDICE D – Perfis Cromatográficos de Quantificação de Resíduos de Antibióticos em Uma Amostra de Leite em Pó.....	102

LISTA DE TABELAS

1 - Limites máximos permitidos de resíduos de antibióticos no leite, de acordo com o Codex Alimentarius, União Européia (UE) e Brasil	18
2 - Alguns kits comerciais para identificação de antibióticos em leite.....	25
3 - Métodos cromatográficos para determinação de antibióticos em diferentes matrizes alimentícias.....	27
4 - Amostras de leite coletadas por região e por tipo de leite	28
5 - Transições monitoradas e parâmetros do espectrômetro no <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM), de Q1/Q3 com as energias de <i>Declustering Potential</i> (DP), <i>Energy Potential</i> (EP), <i>Collision Cell</i> (CE), <i>Collision Cell Exit Potential</i> (EXP) e Tempo de Retenção Relativo (TR).....	41
6 - Condições dos parâmetros da fonte do espectrômetro de massas.....	42
7 - Gradiente de eluição da fase móvel e de fluxo para as condições analíticas de separação dos antibióticos das classes aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclins por CLAE.....	42
8 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos antibióticos em amostras adicionadas de diferentes concentrações de padrão utilizando padrão externo e interno	54
9 - Limites de detecção e quantificação do equipamento (LDE e LQE) e do método (LQE e LQM), e limites de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) do método	55
10 - Ocorrência e teores de antibióticos em amostras positivas de leite em pó, leite UHT e leite pasteurizado.....	57
11 - Quantidade e percentual de resíduos de tetraciclins encontrado nas amostras de leite por regiões brasileiras e tipo de leite	58
12 - Quantidade e percentual de resíduos de enrofloxacin, ciprofloxacin e somatório de gentamicina encontrados nas amostras de leite por regiões brasileiras e tipo de leite.....	60
13 - Quantidade e percentual de resíduos de neomicina, doxiciclina e norfloxacin encontrados nas amostras de leite por regiões brasileiras e tipo de leite	62

LISTA DE FIGURAS

1 - Estrutura química das tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina).	19
2 - Esquema de epimerização da tetraciclina.	19
3 - Estrutura química dos aminoglicosídeos (neomicina e gentamicina).	20
4 - Estrutura química das fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina).	21
5 - Esquema demonstrando utilização do kit SNAP.	34
6 - Perfil cromatográfico do padrão em solvente na m/z dos fragmentos de quantificação dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfafenazol.	43
7 - Comparação dos perfis cromatográficos do leite fortificado, padrão em solvente, branco de reagentes e branco de leite na m/z dos fragmentos dos antibióticos.	46
8 - Gráficos da linearidade da PE e PI em solvente da Gentamicina C1, Gentamicina C1a, Neomicina, Ciprofloxacina e Enrofloxacina.	48
9 - Gráficos da linearidade da PE e PI em solvente do Norfloxacina, Tetraciclina, Oxitetraciclina Clortetraciclina e Doxiciclina.	49
10 - Linearidade da PE e PI em solvente e matriz da Gentamicina C1, Gentamicina C1a, Neomicina, Norfloxacina e Enrofloxacina.	51
11 - Linearidade da PE e PI em solvente e matriz do Ciprofloxacina, Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina e Doxiciclina.	52
12 - Distribuição percentual das amostras positivas para o somatório de tetraciclina (clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina) por tipo de leite e região.	57
13 - Distribuição percentual das amostras positivas por tipo de leite e região para somatório de Enrofloxacina e Ciprofloxacina.	59
14 - Distribuição percentual das amostras positivas por tipo de leite e região para Doxiciclina e Norfloxacina.	63
15 - Distribuição % das amostras positivas por região para resíduos de antibióticos nas amostras em geral.	64

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CC α	Limite de decisão
CC β	Capacidade de detecção
CE	Energia de Colisão
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo/íon trap
CXP	Potencial de colisão na célula de saída
DP	Potencial de declustering
EMEA	European Medicine Agency
EP	Potencial de entrada
EUA	Estados Unidos da America
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow Injection Analysis (Análise de Injeção em Fluxo)
FSCJ	Food Safety Commission of Japan
FUNED/IOM/DI	Fundação Ezequiel Dias/Instituto Octávio Magalhães/ Divisão de
VISA/SQ/ LAM	Vigilância Sanitária e Ambiental/Serviço de Química/Laboratório de Análise de Microcomponentes
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
LANAGRO	Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MRN	Multiple Reaction Monitoring (Monitoramento de Reações Múltiplas)
OIE	World Organization for Animal Health
TCA	Ácido tricloroacético
UE	União Européia
VISAs	Vigilâncias Sanitárias

RESUMO

Um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo/íon trap (CLAE-EM/EM) foi desenvolvido e validado para a análise de resíduos de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina) e tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) em leite. A extração dos resíduos de antibióticos foi realizada por agitação com ácido tricloroacético 5%, usando sulfafenazol como padrão interno, centrifugação e análise por CLAE-EM/EM com ionização electrospray no modo positivo. A recuperação foi de 87,7 a 119% para as tetraciclina, 83,3 a 110,3% para as fluoroquinolonas e 71,9 a 103,8% para os aminoglicosídeos. Os limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção foram adequados para o uso proposto. O método validado foi adequado ao uso pretendido. Foram analisadas 890 amostras de leite do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) e mais da metade (54,8%) das amostras apresentaram algum tipo de antibiótico. Observou-se que 18,4% das amostras apresentaram resíduos de doxiciclina e norfloxacina, os quais não são permitidos pela legislação brasileira em animais produtores de leite. As amostras da região sul foram as que apresentaram maior ocorrência de antibióticos (66,4%), entretanto, a região norte foi a que apresentou um maior percentual de condenação de amostras (27%).

Palavras-chaves: aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina, CLAE-EM/EM.

ABSTRACT

Tetracyclines, aminoglycosides and fluoroquinolones residues in milk by HPLC-MS/MS.

A high performance liquid chromatography method coupled with a triple quadrupole mass spectrometer/ion trap (HPLC-MS/MS) was developed and validated to analyze antibiotic residues in milk, among them, aminoglycosides (gentamicin and neomycin) fluoroquinolones (ciprofloxacin, norfloxacin and enrofloxacin) and tetracyclines (tetracycline, oxitetracyclinas, clortetracyclinas and doxycycline). Extraction of the antibiotic residues was carried out with 5% trichloroacetic acid (TCA) followed by centrifugation. Sulfaphenazole was used as internal standard. The HPLC-MS/MS was operated in the positive mode. Recovery ranged from 87.7 to 119% for tetracyclines, 83.3 to 110.3% for fluoroquinolones and 71.9 to 103.8% for aminoglycosides. The validated method was suitable for the intended use. 890 milk samples from PAMVet were evaluated. Overall, more than half (54.8%) of the samples contained some type of antibiotic. 18.4% of the samples contained doxycycline and norfloxacin residues, which are not allowed by Brazilian law in milk producing animals. Considering antibiotics use by geographic regions, the highest prevalence was observed in the southern region (66.4%), whereas in the northern region, the highest percentage of condemnation (27%) was observed.

Keywords: aminoglycosides, quinolones, tetracyclines, HPLC-MS/MS.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais consumidos pela população mundial, seja puro ou como derivado. Sua grande importância para o homem é antiga, vem desde a domesticação dos animais e da agricultura, sendo o mais versátil alimento de origem animal, visto que pode ser utilizado na dieta de várias formas. O leite é recomendado mundialmente para crianças e adultos, pois é um dos alimentos mais completos do mundo e uma fonte rica de proteínas, vitaminas e minerais, tais como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e zinco (CUNHA, 2009; NEBOT et al., 2012; TROMBETE et al., 2014).

O Ministério da Saúde do Brasil em seu guia alimentar recomenda o consumo de três porções ao dia de leite e derivados, em horários distintos das refeições principais, pois o cálcio interfere negativamente na absorção de ferro de origem vegetal. O leite deve ser preferencialmente consumido in natura (BRASIL, 2005; 2014; 2015). E a qualidade higiênica e sanitária do leite deve ser adequada (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Recentemente houve uma mudança significativa na cadeia do leite. No período de 1990 a 1998, o acondicionamento e o transporte do leite, que eram feitos em latões nas propriedades rurais, passaram para a coleta a granel em tanques refrigerados (HARTMANN, 2009). Em 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) editou a Instrução Normativa 51/2002 que estabeleceu os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade dos Leites tipos A, B, C, pasteurizado, cru e refrigerado e também o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Estes fatos proporcionaram um grande avanço em termos da qualidade do leite (BRASIL, 2002; HARTMANN, 2009). Uma das preocupações relacionadas à segurança do leite consiste em evitar ou diminuir a ocorrência de contaminantes que podem advir do uso indiscriminado de pesticidas e drogas veterinárias ou devido às contaminações ambientais e de armazenamento inadequado. Os resíduos sejam de micro-organismos patogênicos, toxinas, pesticidas, agentes antimicrobianos e metais tóxicos colocam em risco a saúde dos consumidores, necessitando assim o controle destes nos alimentos (DONKOR et al., 2011; MARTIN, 2011). Dentre estes, os medicamentos veterinários, como os antibióticos, constituem preocupação, pois são bastante utilizados no tratamento de doenças do gado, principalmente no controle da mastite. Estes são frequentemente detectados no leite, muitas vezes, pelo fato do período de carência não ser respeitado ou por mau uso dos

medicamentos veterinários (NERO et al., 2007). A presença de resíduos de antibióticos no leite envolve riscos de saúde pública, pois pode gerar um aumento da resistência bacteriana com seleção de cepas bacterianas resistentes. Além disso, podem causar reações tóxicas ou alérgicas em indivíduos susceptíveis, desequilíbrio da microbiota intestinal, efeito teratogênico e pequenas quantidades podem determinar resistência crônica em humanos (NERO et al., 2007; CUNHA, 2009; SILVA et al., 2014; TROMBETE et al., 2014).

Além das questões relacionadas à saúde humana, na indústria de laticínios, o controle de resíduos de antibióticos é muito importante em termos de qualidade devido à inibição das culturas lácticas utilizadas no fabrico de produtos fermentados como o iogurte, leites fermentados, manteiga e queijo, levando à rejeição do leite e de seus produtos lácteos (CUNHA, 2009; SILVA et al., 2013; TROMBETE et al., 2014).

Assim, alguns esforços têm sido criados no sentido de minimizar o problema e garantir a qualidade do leite e outros produtos de origem animal. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 253/03, criou o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (BRASIL, 2003b). Este propõe estabelecer metodologia analítica validada segundo os critérios estabelecidos pela Decisão 657/EC/2002 (EC, 2002), devendo-se considerar, simultaneamente, os seguintes itens: a exatidão, a precisão, a especificidade, a linearidade, a sensibilidade e a robustez com as devidas considerações estatísticas (EC, 2002; VALENTINI et al., 2007; PASCHOAL et al., 2008; INMETRO, 2011). Foi também criado, pelo MAPA, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal (PNCRC/Animal). Este é uma ferramenta de *Gerenciamento de Risco* cujo objetivo é promover a garantia de qualidade dos sistemas de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas e é composto de programas setoriais para o monitoramento de produtos de origem animal, dentre eles, o leite. As análises das diversas matrizes e espécies animais monitoradas são realizadas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, composta pelos Laboratórios Nacionais Agropecuários – LANAGROs e por laboratórios privados/públicos credenciados pelo MAPA (BRASIL, 2011).

São dois os tipos de métodos disponíveis: os de triagem e os confirmativos. Os métodos de triagem como o de inibição microbiana e testes imunológicos são muito utilizados nas análises e monitoramento de resíduos de antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 2007). Os ensaios imunoenzimáticos são os mais utilizados devido a sua sensibilidade, especificidade, praticidade e rapidez de execução (MORAIS et al., 2010).

Entretanto, as amostras positivas devem ser submetidas a testes confirmatórios utilizando técnicas analíticas de maior sensibilidade e especificidade (OLIVEIRA et al., 2007). Os métodos mais utilizados são cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diversos tipos de detectores, sendo o de espectrometria de massa o mais utilizado devido a sua alta sensibilidade e especificidade (MARTINS-JÚNIOR et al., 2006; RÜBENSAM et al., 2011; PACHECO-SILVA et al., 2014).

Considerando o exposto acima e visando garantir a segurança associada ao leite, este trabalho teve como objetivo avaliar o leite disponível no mercado consumidor do Brasil quanto à presença e quantidade de resíduo de antibióticos das classes das tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo/íon trap (CLAE-EM/EM).

Os objetivos específicos foram:

- i) confirmar o limite de detecção do kit SNAP tetraciclina, fazer o screening de amostra de leite provenientes do estado de Minas Gerais e comparar com os resultados obtidos por CLAE-EM/EM;
- ii) desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE-EM/EM para separar, identificar e quantificar resíduos de tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas na matriz leite; e
- iii) aplicar a metodologia validada em amostras de leite comercializadas no Brasil, no intuito de verificar os níveis de resíduos e compara-los com a legislação vigente.

REVISÃO DA LITERATURA

1. ANTIBIÓTICOS

A descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1928 e o processo de sua industrialização proporcionaram intensas pesquisas na busca de novos antibióticos para tratamento de doenças infecciosas (GUIMARÃES et al., 2010).

Os antimicrobianos são compostos que, utilizados nas concentrações inibitórias ideais, reduzem ou inibem o crescimento microbiano. Nesta classe incluem-se os antibióticos e os quimioterápicos. Os antibióticos são substâncias produzidas naturalmente por fungos, leveduras ou outros microrganismos e os quimioterápicos são substâncias químicas produzidas por síntese (MOREIRA, 2004). Os antibióticos e antimicrobianos comportam-se como moléculas químicas que interferem em alguma via metabólica de um microrganismo ou célula-alvo.

Os antimicrobianos são importantes fármacos usados na medicina humana e veterinária. Nesta última, é utilizado para fins de tratamento terapêutico de infecções, uso profilático para a prevenção de doenças antes ou após exposição a esta, e como aditivos em ração para promover o crescimento do animal. São amplamente empregados em todas as fases de produção, ou ciclo de vida dos animais, principalmente nas infecções da glândula mamária (mastite) e em doenças de trato respiratório (BUZALSKI & REYBROECK, 1997; SHAO et al., 2009).

Segundo Mitchell et al. (1998), teoricamente, todas as vias de administração do antibiótico levam ao aparecimento de resíduos nos alimentos de origem animal. Assim, vários compostos presentes nos organismos dos animais podem ser transferidos para a população através do leite e dos produtos lácteos. Os antibióticos podem ser secretados no leite por difusão, todavia, a diferença de pH existente entre o plasma e o leite pode elevar, ainda mais, sua concentração no leite. As diferenças existentes nas concentrações encontrados na secreção do leite podem ser atribuídas às classes de antibióticos, ao tipo de formulação do antibiótico aplicado, às variações entre as espécies, à quantidade de leite produzido e do período de carência (COSTA, 1996; SHAO et al., 2009).

A presença de resíduo de medicamentos veterinários em alimentos tem sido frequentemente relatada na literatura nacional e internacional (LOPEZ et al., 2008; BANDO et al., 2009; BERENDSEN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012; TROMBETE

et al., 2014). Estes resíduos podem ser perigosos para a saúde dos consumidores. Em curto prazo, podem causar reações alérgicas e tóxicas em alguns indivíduos sensíveis, e a longo prazo, podem resultar em efeitos tóxicos crônicos ou o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos em humanos (RAISON-PEYRON, 2001; GOMES & DEMOLY, 2005; SILVA et al., 2010; BANDEIRA et al., 2014; GASTALHO et al., 2014; SILVA, et al., 2014).

Na indústria de laticínios, a presença de resíduos de antibióticos pode acarretar perdas econômicas drásticas, porque pode induzir a inibição dos processos fermentativos de origem bacteriana, que é à base da fabricação de diversos produtos lácteos (LAMB & COOK, 1982; CUNHA, 2009), além de alterar as características sensoriais dos produtos. De acordo com Fagundes & Molin (1998), os queijos originários do leite contendo resíduos de antibióticos não dessoram bem e os micro-organismos ou as culturas adicionadas são inibidos, levando à proliferação de microrganismos gasógenos. Na produção do iogurte, a presença de antibióticos interfere de forma significativa, porque as culturas utilizadas são sensíveis a algumas classes de antibióticos. Portanto, pode ocorrer o desequilíbrio microbiano, favorecendo a proteólise e a dessoragem do produto, conferindo um aspecto desagradável.

Desta forma, há a necessidade de monitorar a ocorrência e níveis de antimicrobianos em leite. São diversos os métodos analíticos disponíveis, entretanto, a grande diversidade de compostos que podem deixar resíduos nos alimentos, os seus possíveis metabolitos, e a baixa concentração (níveis de parte por milhão), além da complexidade da matriz, são fatores que dificultam a análise (BLASCO et al., 2007).

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 42 (BRASIL, 1999), 'estabelecer Limites Máximo de Resíduos (LMRs) é competência do Ministério da Saúde'. Quando não estiverem estabelecidos, utilizam-se os internalizados recomendados pelo Mercosul, *Codex Alimentarius*, os constantes nos Regulamentos ou Diretivas da União Europeia ou os usados pelo Food and Drug Administration (FDA). Atualmente o Regulamento Técnico do Mercosul GMC Resolução Nº 54/00 foi incorporado pela Resolução RDC Nº 53/2012 (BRASIL, 2012). Os limites para resíduos foram estabelecidos na forma de tolerância ou limite máximo de resíduos (LMR), que é definido como a tolerância máxima de resíduo resultante do uso de medicamentos veterinários nos alimentos, expressa em µg/kg ou µg/L. Na Tabela 1 estão apresentados os LMRs de antibióticos dos grupos dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas pesquisados. Estes foram baseados na legislação brasileira e, os não contemplados, basearam nos LMRs do Codex Alimentarius e União

Européia. O monitoramento de alimentos de origem animal é necessário, para evitar que os LMRs sejam ultrapassados.

Tabela 1 - Limites máximos permitidos de resíduos de antibióticos no leite, de acordo com o Codex Alimentarius, União Europeia (UE) e Brasil

Grupo de	Substância	LMR	Referência
Antimicrobianos	farmacologicamente ativa	(µg/L)	
Tetraciclinas	Tetraciclina	Soma	Codex, UE* e Brasil
	Oxitetraciclina	100	
	Clortetraciclina		
	Doxiciclina	NA	UE
Aminoglicosídeos	Neomicina	1500	UE e Codex
		500	
	Gentamicina	100	UE
		200	Codex
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Soma	UE
	Enrofloxacin	100	
	Norfloxacin	ND	ND

Fonte: UE (2010); Brasil (2012); Codex Alimentarius (2015).

NA - não se aplica (não pode ser utilizado em animais produtores de leite).

ND – não definido.

* Na UE tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina são especificadas individualmente em vez de soma.

1.1. Tetraciclinas

Os antibióticos da classe das tetraciclinas têm em comum uma estrutura hidronaftacênica. Estes apresentam um amplo espectro de ação antimicrobiana, pois atuam sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo espécies como espiroquetas, micoplasmas, riquetsias e actinomices (BLASCO et al., 2009). Pertencem a este grupo: a oxitetraciclina, a tetraciclina, clortetraciclina e a doxiciclina. Na Figura 1 estão apresentadas as fórmulas estruturais destes antibióticos.

Em condições ácidas, as tetraciclinas sofrem epimerização no átomo de carbono 4 para formar uma mistura, em equilíbrio e o epímero resultante é denominado de 4-epi seguido do nome da tetraciclina que lhe deu origem (Figura 2). Segundo Florence e Attwood (2003), a velocidade de degradação é dependente do pH (epimerização máxima ocorrendo a pH 3,2) e catalisada por íons fosfato e citrato. As epi-tetraciclinas possuem uma atividade terapêutica reduzida quando comparada àquela dos isômeros naturais.

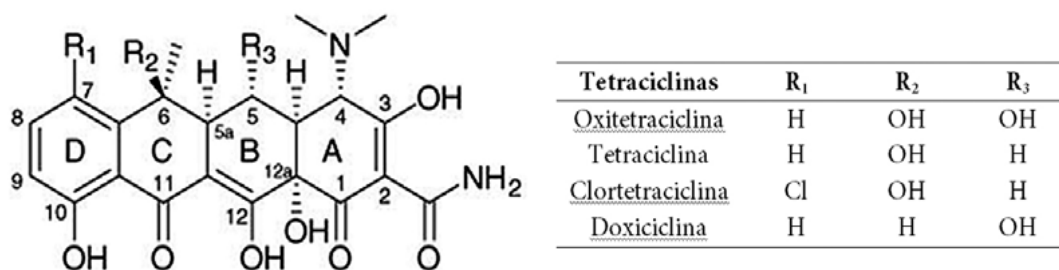


Figura 1 - Estrutura química das tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina). Fonte: Prado e Machinski Junior (2011).



Figura 2 - Esquema de epimerização da tetraciclina. Fonte: Florence e Attwood (2003).

As tetraciclina agem inibindo a síntese de proteínas em nível dos ribossomos 30s e são indicadas no tratamento de infecções gastrointestinais, hepáticas, renais e mamites, principalmente as estafilocócicas (REESE & BETTS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 1998).

As tetraciclina possuem baixa toxicidade, baixo custo e, na maioria dos casos, podem ser administrados por via oral. Mas mesmo assim podem causar choque anafilático, urticária, eritema multiforme, eczema, dermatites, alterações hepáticas, além de resistência bacteriana (RODRÍGUEZ et al., 1998; PEREIRA-MAIA et al., 2010; OGITA et al., 2011).

De acordo com o Codex Alimentarius (2015), a avaliação da Ingestão Diária Aceitável (IDA) realizada pelo JECFA para o somatório de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina é 30 µg/Kg peso corpóreo por dia. Para a doxiciclina a IDA é 3 µg/Kg peso corpóreo por dia (EMEA, 1997).

para a replicação do DNA. Por possuírem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, biodisponibilidade, boa penetração nos tecidos, longas meias vidas séricas e uma boa segurança, estes antimicrobianos se tornaram excelentes antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas. Entretanto, registrou-se um aumento significativo de resistência bacteriana tanto em animais como em humanos, interferindo diretamente na resposta do tratamento clínico. As cepas bacterianas resistentes surgiram inicialmente em animais expostos aos medicamentos e posteriormente transmitidos ao homem via cadeia alimentar (REESE & BETTS, 1995; SILVA & HOLLENBACH, 2010; SOUZA et al., 2010). As IDAs da norfloxacin e o somatório da ciprofloxacina e enrofloxacin são 14, e 2 µg/Kg peso corpóreo por dia, respectivamente (FAO, 2012; FSCJ, 2014). Na Figura 4 são apresentadas as estruturas químicas da ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacin.

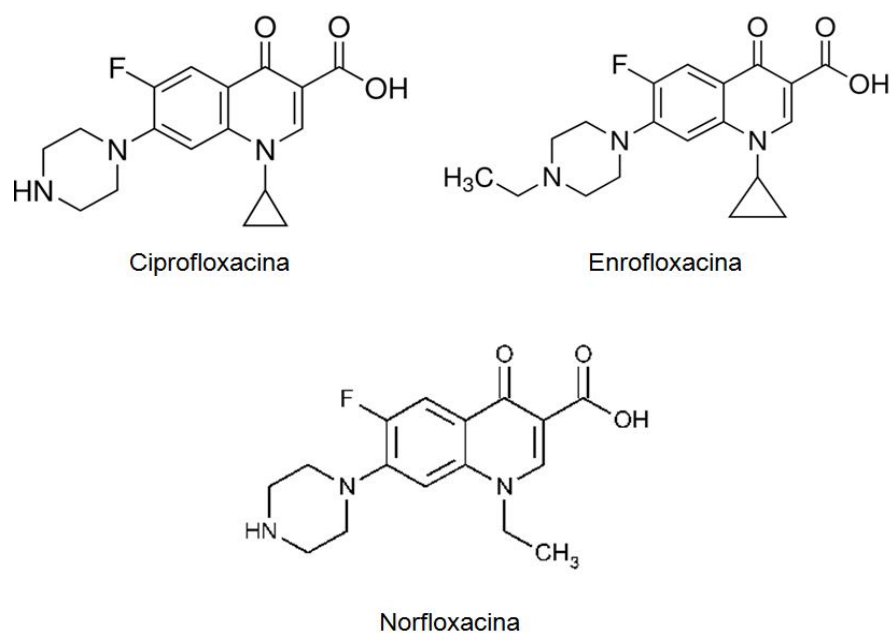


Figura 4 - Estrutura química das fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacin). Fonte: Sigma-Aldrich (2012).

2. OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE

O leite, assim como seus derivados, são importantes componentes de uma dieta saudável, pois são ricos em proteínas, vitaminas, e sais minerais, são fonte importante de riboflavina e principal fonte de cálcio na alimentação, exceto a manteiga e o creme

de leite que são compostos praticamente de gordura (OMS, 2003; BRASIL, 2005; ROSOLEN et al., 2013).

De acordo com o Guia Alimentar da População Brasileira, o consumo de leite e derivados é importante em todas as fases do curso da vida, particularmente na infância, na adolescência, na gestação e para adultos jovens na forma integral e com menor teor de gordura para os adultos (BRASIL, 2005). A ingestão de laticínios com baixo teor de gordura está associada ao menor risco de diabetes tipo 2 e hipertensão. A quantidade de cálcio e vitamina D presentes nos produtos lácteos tem efeitos benéficos no metabolismo da glicose, na pressão arterial e na regulação do peso corporal (MARTINI & WOOD, 2009; PASSANHA et al., 2011).

Somente em 2014, no Brasil, foram adquiridos, pelas indústrias processadoras de leite 24,741 bilhões de litros de leite, sendo que somente Minas Gerais adquiriu 6,589 bilhões de litros, o que corresponde a 26,6% do total nacional (IBGE, 2015). Estes números devem aumentar ainda mais uma vez que o leite produzido pela economia informal não foram contabilizados.

Segundo o Codex Alimentarius (2015), o resíduo de medicamentos veterinários é a fração da droga administrada, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento originário de animais tratados. A presença destes resíduos no leite resulta do uso inadequado do medicamento veterinário e/ou da contaminação acidental durante o transporte ou armazenamento.

O uso de antibióticos em animais produtores de leite é imprescindível nos casos de infecções, tais como a mastite, doença que afeta as glândulas mamárias e reduz a produção de leite. Porém, o emprego de antibióticos vem se apresentando de forma indiscriminada (CUNHA FILHO et al., 2006; NERO et al., 2007; FONTANA et al., 2010). O uso extensivo destes compostos pode provocar o desenvolvimento de bactérias resistentes, o que tornou, nos últimos anos, uma preocupação internacional (LEE et al., 2007; PERICÁS et al., 2010).

No Brasil existem vários levantamentos sobre a ocorrência de resíduo de antibióticos em alimentos, entretanto, a maioria dos estudos é baseada em métodos de detecção rápida, ou seja, de triagem, que podem apresentar resultados positivos abaixo dos limites estabelecidos pela legislação do país ou gerar resultados falso-negativos, se não forem empregados de forma correta (NASCIMENTO et al., 2001; ALMEIDA et al., 2003; NUNES & D'ANGELINO, 2007; FAVA & PINTO, 2010; SANTOS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012; ARAUJO et al., 2015).

Para ter uma avaliação mais consistente e confiável dos resultados é necessário validar técnicas mais precisas para identificação e quantificação dos resíduos de antibióticos nos alimentos. Dentre estas, destacam as cromatografias líquida e gasosa acopladas a diversos tipos de detectores (AFSSA, 2010; SILVA et al., 2010b; BOHM et al., 2011; JIMÉNEZ et al., 2011; PRESTES et al., 2013; TROMBETE et al., 2014).

Devido ao exposto, e por ser o leite um alimento muito importante, há necessidade de desenvolver e validar um método de multirresíduos para ser aplicado a amostras de leite.

3. MÉTODOS DE ANÁLISES DE ANTIBIÓTICOS

Os métodos para análise de resíduos de antibióticos em alimentos podem ser agrupados em métodos de triagem ou quantitativos. Estas podem se basear em técnicas microbiológicas (inibição do crescimento microbiano, receptor microbiano, enzimáticos e colorimétricos), imunoquímicas (interações antígeno-anticorpo), cromatográficas, eletroforéticas e espectrométricas (MCGLINCHEY et al., 2008). De acordo com Cháfer-Pericás et al. (2010), os métodos de análise de resíduos de antibióticos podem ser agrupados de acordo com a técnica analítica utilizada. O percentual de utilização de cada técnica corresponde a 18% de ELISA; 18% de CLAE/UV, 8% por biossensores, 12 por outros métodos e 38% por espectrometria de massas.

3.1. Métodos de triagem

Os métodos de triagem incluem testes microbiológicos e imunoenzimáticos. Os testes microbiológicos são baratos, fáceis de executar em grande escala, e possuem um grande espectro em número de classes de antibióticos analisados, porém não são específicos (MCGLINCHEY et al., 2008; CHÁFER-PERICÁS et al., 2010).

As concentrações de antibióticos determinadas por estes métodos variam devido à sensibilidade aos inibidores naturais do leite, podendo levar a um resultado falso-positivo (HALBERT et al., 1996; ZENG et al., 1996). Os ensaios microbiológicos não fornecem informação sobre a identidade dos resíduos dos antibióticos necessitando confirmação direta por métodos cromatográficos (GAUDIN et al., 2004). Os testes

imunoenzimáticos são mais específicos, pois os antibióticos podem ser identificados por classe (MCGLINCHEY et al., 2008; DISERENS et al., 2009; HOFF et al., 2012; BUKET et al., 2013).

Os métodos de triagem químicos geralmente são mais elaborados, pois precisam de uma preparação de amostras e por isso são associados a métodos de separação. A cromatografia por camada delgada (CCD) tem sido utilizada como um método de triagem. Sistemas de biossensores são técnicas rápidas e confiáveis na preparação de amostra e também são usadas como kit de triagem (DIETRICH, 2008; MCGLINCHEY et al., 2008; DISERENS et al., 2009).

Na Tabela 2 estão apresentados os principais kits comerciais para a identificação de antibióticos em leite, juntamente com o tipo de método, tempo de análise, produtor, país de origem e classe de antibióticos identificados.

3.2. Métodos cromatográficos

3.2.1. Métodos para clean-up e extração

A análise de antibióticos em alimentos nas diversas matrizes é muito complexa, Matrizes alimentares como tecidos animais, leite, mel e ovos contêm muitas substâncias interferentes que precisam ser removidas seletivamente, sem perda do analito de interesse. Muitas vezes os analitos precisam ser concentrados para uma melhor detecção. Logo a extração e métodos de “clean up” desempenham papel muito importante. (MCGLINCHEY et al., 2008; BOGIALLI et al., 2009; KAUFMANN & WIDMER, 2013).

As técnicas usuais utilizadas para extração e “clean up” de amostras para as diversas matrizes de alimentos incluem a precipitação da proteína, desengorduramento, hidrólise de açúcares, extração líquido-líquido e extração em fase sólida, podendo ou não ser precedida por extração líquido pressurizado, extração com solventes e tampões, e uso de ultra-som e centrífuga.

A precipitação da proteína geralmente é obtida com metanol, acetronitrila (ACN), ácido tricloroacético (TCA), ou ácido perclórico. Quando necessário, os extratos são desengordurados com hexano (HELLER et al., 2005; MCGLINCHEY et al., 2008; BLASCO et al., 2009; MORENO-BONDI et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2011).

Tabela 2 - Alguns kits comerciais para identificação de antibióticos em leite

Tipo de teste / Marca comercial	Tempo análise (min)	Fabricante	País de origem	Classe de antibióticos identificados
Enzimático				
Charm Rosa tetra	< 9	Char Sciences		tetraciclina
Snap tetra, gentamicin	< 10	IDEXX	EUA	tetraciclina e gentamicina
Charm Quinolona	< 9	Char Sciences		quinolona
BetaStar® Combo	< 6	Neogen Corporation	EUA	β-lactâmicos e tetraciclina
Charm II (Neomycin Type) Aminoglyco-side Test	16	Charm Sciences, Inc.	EUA	gentamicina e neomicina
Twinsensor	6	UNISENSOR	Bélgica	β-lactâmicos e tetraciclina
Twin Fluorescência	< 7	Unisensor	Bélgica	β-lactâmicos e tetraciclina
Parallux tetra	< 5	IDEXX	EUA	tetraciclina
Imunoensaio				
TECNA – Gentamicin Neomycin	30 e 60	Tecna S.r.l.	Itália	gentamicina e neomicina
BR-Test AS Special	120	DSM	Holanda	aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclina, macrolídeos e β-lactâmicos
Paralux	4	MEDEXX Co., Ltda	Coreia	aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclina, quinolonas e β-lactâmicos
ROSA Enrofloxacin	8	Charm Sciences, Inc	EUA	enrofloxacin
EIA Gentamicin Streptomycin	120	EuroProxima		gentamicina e estreptomicina
Biológico				
BR-Test AS Brilliant	165	DSM	Holanda	aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclina, β-lactâmicos e macrolídeos
BRT Inhibitor Test - BRT MRL-Screening Test	120 a 150	AiM	Alemanha	aminoglicosídeos, sulfas, cloranfenicol, tetraciclina, β-lactâmicos e macrolídeos
Eclipse 100	150 a 180	Inmunotec	Espanha	aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclina, β-lactâmicos e macrolídeos
CoPan	150 a 180	CoPan	Itália	aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclina, β-lactâmicos, macrolídeos, anfenicois e novobiocina
Delvo-test	150 a 180	DSM	Holanda	aminoglicosídeos, sulfas, tetraciclina, β-lactâmicos, macrolídeos, anfenicois e novobiocina

Fonte: Adaptado de FSAI (2002), Dietrich (2008) e Diserens et al. (2009).

A combinação de uma ou mais técnicas de extração é muito usada para melhor purificação das amostras, evitando assim o efeito de matriz e ou supressão dos analitos. A precipitação com ácido ou solvente e posterior purificação em cartuchos de fase sólida ou extração líquido-líquido com utilização de tampões podem ser utilizadas (MCGLINCHEY et al., 2008; SPISSO et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2011).

Recentemente várias pesquisas tem sido feitas para determinar resíduos pelo método QuEChERS, com bons resultados analíticos, pois são rápidos, fáceis, eficazes, robustos e seguros. Este método de extração ajuda a evitar a supressão ou aumento da ionização causada pela matriz (PRESTES et al., 2011, RODRIGUES et al., 2011; CABRERA et al., 2012; LOPES et al., 2012; QUEIROZ et al., 2012; BRONDI et al., 2013; PRESTES et al., 2013; TROMBETE et al., 2014).

3.2.2. Métodos de análise

Os métodos de identificação e quantificação de antibióticos utilizados pelos laboratórios nacionais de referência são os de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência ou ultra violeta (DF ou UV), e CLAE acoplada a espectrometria de massa (EM ou EM/EM) (BRASIL, 2011).

As análises de identificação e separação por CLAE-UV, CLAE- DF, CLAE com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD), CLAE-EM ou CLAE-EM/EM são as mais utilizadas nas análises de resíduos de medicamentos veterinários (GORLA et al., 1997; MARTINS-JÚNIOR et al., 2006; BRABANDER et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2011; PRESTES et al., 2013; PACHECO-SILVA et al., 2014). Entretanto CLAE-EM/EM tem sido a técnica mais utilizada devido à alta especificidade analítica, confiabilidade e sensibilidade (MARTINS-JÚNIOR et al., 2006; MCGLINCHEY et al., 2008; BRABANDER et al., 2009; RÜBENSAM et al., 2011).

Na Tabela 3 estão descritos alguns métodos cromatográficos para análise dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas, juntamente com um apanhado sobre o clean-up/extração e métodos empregados pelos diversos autores.

Tabela 3 - Métodos cromatográficos para determinação de antibióticos em diferentes matrizes alimentícias

Classe de antibióticos	Alimento	Clean-up/ extração	Método	Referência
Aminoglicosídeos	Bovinos, suínos, fígado de aves, rim, músculo	TCA /cartucho de fase sólida de troca catiônica fraca	CLAE-EM/EM	USDA (2011)
Gentamicina	Leite, rins, plasma, urina	Desengordurar/TCA/cartucho fase sólida C ₁₈	CLAE-EM/EM	HELLER et al. (2005)
Beta lactâmicos, sulfas, tetraciclina, macrolídeos	Leite	ACN e ACN com NaCl	CLAE-EM/EM	MARTINS-JÚNIOR et al. (2007)
Quinolonas	Músculo, rim, pele, fígado, penas de galinha	NH ₄ OH + ACN e extração líquido-líquido (acetato de amônio 1 M e éter)	CLAE-EM/EM	SAN MARTÍN et al. (2007)
Tetraciclina	Leite	Desproteínização com tampão McIlvaine-EDTA utilizando centricon/cartucho fase sólida HLB Oasis	CLAE/DF	INCQS (2009)
Tetraciclina	Leite	TCA em acetonitrila e centrifugação	CLAE/DAD	DENOBILO & NASCIMENTO (2004)
Tetraciclina	Leite	Tampão de succinato sódio pH 4,0/centrifugação/quelação com Cu ⁺⁺ ligados à resina quelante /eluída com tampão McIlvaine-EDTA pH 4,0	CLAE/UV (detector ultravioleta)	JUNQUEIRA et al. (2005)
Tetraciclina	Leite	Tampão McIlvaine-EDTA/ cartucho SampliQ OPT	CLAE-EM/EM	FANG et al. (2009)
Quinolonas	Plasma, rim, músculo e fígado de frango	TCA + ACN/Cartuchos de fase sólida C18 Bond Elut e fase reversa mista trocador iônico Narc-2	CLAE/DAD	SILVA (2004)
Tetraciclina, sulfas, cloranfenicol	Leite	TCA em metanol/tampão McIlvaine pH 4,0/Cartuchos de fase sólida Oasis HLB	CLAE/DAD	MAMANI (2007)
Aminoglicosídeos, lincosamidas, tetraciclina, quinolonas	Músculo, leite	TCA 5% e centrifugação	CLAE-EM/EM	AFSSA (2010)
Macrolídeos, lincosamidas, quinolonas, tetraciclina, pleuromutilinas	Mel	tampão McIlvaine EDTA pH 4,0/Cartuchos de fase sólida Oasis HLB/água e metanol	CLAE-EM/EM	BOHM et al. (2012)
11 classes de antibióticos	Água	tampão McIlvaine EDTA pH 4,0/Cartuchos de fase sólida Oasis HLB e SAX/água e HACN	CLAE-EM/EM	ZHOU et al. (2012)
8 classes de antibióticos	Músculo de boi e porco	tampão McIlvaine EDTA pH 4,0/Cartuchos de fase sólida Oasis HLB e SAX/água e metanol	CLAE-EM/EM	BOHM et al. (2011)

TCA – ácido tricloroacético; ACN – acetonitrila.

DF- Detetor de fluorescência; DAD - detetor arranjo de diodos; UV - detetor ultravioleta.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Amostras

As amostras de leites em pó, ultra high temperature - UHT (130 a 150°C por 2 a 3 segundos e resfriado imediatamente à 32°C) e pasteurizado (72 a 75°C por 15 a 20 segundos e resfriado imediatamente à 4°C) foram coletadas aleatoriamente pelas Vigilâncias Sanitárias (VISAs) de todos os Estados do Brasil e do Distrito Federal nos anos de 2008 a 2011, perfazendo um total de 890 amostras de leite de lotes diferentes e distribuídas por regiões conforme indicado na Tabela 4. As amostras foram mantidas em freezer até o momento da análise.

Tabela 4 - Amostras de leite coletadas por região e por tipo de leite

Regiões do Brasil	Leite			Total
	Em pó	UHT	Pasteurizado	
Centro oeste	29	55	37	121
Nordeste	103	141	21	265
Norte	59	100	0	159
Sudeste	48	83	104	235
Sul	18	68	24	110
Total	257	447	186	890

As amostras estavam acompanhadas de um termo de coleta, contendo informações sobre: local de coleta, fabricante, marca, temperatura e outras informações pertinentes. Estas foram enviadas para o Serviço de Gerenciamento de amostras e posteriormente ao Laboratório de Análise de Microcomponentes do Instituto Otávio Magalhães da Divisão de Vigilância Sanitária da Fundação Ezequiel Dias (FUNED/IOM/DIVISA/SGA).

Dentre as amostras do Estado de Minas Gerais, 120 amostras (25 de leite em pó; 38 de leite UHT; e 57 de leite pasteurizado) foram avaliadas quanto à presença de tetraciclina por meio do kit SNAP tetraciclina.

Amostras de leite fluido isenta de antibióticos, foram fornecidas pela fazenda do Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (LANAGRO) de Pedro Leopoldo-MG. As amostras de 1 L foram previamente homogeneizadas, fracionadas em porções de 50 mL e transferidas para frascos de vidro devidamente identificados e armazenadas em freezer. Estas amostras foram usadas como leite controle para análise por CLAE-EM/EM.

1.2. Reagentes, materiais diversos e padrões de antibióticos

Foram utilizados os seguintes reagentes: hidróxido de sódio pa (Vetec, 1002643) ácido tricloroacético pa (Vetec, 0908239), ácido pentafluopropiônico pa (Aldrich, SHBD7102 V), metanol grau CLAE (Panreac, 340627), acetonitrila grau CLAE (Merck, I651830 232).

Os padrões de antibióticos foram sulfato de gentamicina composto da mistura de quatro gentamicinas que são: 27% da C1, 26% da C1a e 47% da soma de C2 + C2a (MP Biomedicals, 9092 K), sulfato de neomicina (USP Rckville, M01253), cloridrato de clortetraciclina (Sigma Aldrich, 5ZBB129XV), cloridrato de tetraciclina (Fluka, 5ZBA140XV), cloridrato de oxitetraciclina (Sigma, BCBF9827V), hclato de doxiciclina (Sigma, BCBF9827V), enrofloxacin (Fluka, SZBA336XV), sulfafenazol (Sigma, SLBC7923V, padrão interno), cloridrato de ciprofloxacino (USP Rockville, 10H307), e norfloxacino (Sigma, SLBF7610V).

Outros materiais utilizados incluíram: Kit Snap para tetraciclina (12086, KC142), leite em pó desnatado *Skim Milk* (Difco, 8120776), filtros para amostras da Millipore® de 0,45 µm de tamanho do poro e 13 mm de diâmetro e coluna Nucleodur da Macherey-Nagel, fase reversa C18 de 150 mm x 4,0 mm, partícula de 5 µm para separação dos antibióticos.

1.3. Vidrarias

Foram utilizadas vidrarias e micropipetas com certificado da Rede Brasileira de Metrologia e as de uso comum do laboratório. Toda a vidraria utilizada foi passada no metanol.

1.4. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: balanças analítica (marca Metre Toledo) e semi-analítica (marca Sartorius), Bloco aquecedor SNAP (modelo 98-13194-03), vortex, ultra centrifuga refrigerada (marca Hitachi, modelo Himac CR21GII, rotor de 20000 rpm), ultra purificador de água (marca Milli-Q), ultra-som, banho-maria, geladeira, freezer de -25 a -30°C, cromatógrafo líquido de alta eficiência (marca Shimadzu, modelo Class-LC-10) composto de sistema desgaseificador por membrana (modelo DGU-20As), duas bombas de alta pressão (modelo LC-20AD UFLC), injetor automático de 1 a 100 µL de capacidade (modelo SIL-20AC), forno para colunas (modelo CTO-20AC) e sistema controlador (modelo CBM-20A, UFLC), computador (marca Dell Precision, modelo T3400), bomba de alto vácuo (marca Agilent, modelo 8499225R001), gerador de nitrogênio (marca Peak Scientific, modelo NM20Z), bomba de infusão direta (marca Harvard Apparatus, modelo 11 Plus), compressor (marca Atlas Copco, modelo SF1FF livre de óleo), detector espectrômetro de massa-massa (marca Applied Biosystems MDS Sciex, modelo 4000 Q TRAP LC/MS/MS), software Analyst® 1.5.1 e estação de controle para aquisição e tratamento de dados via planilha eletrônica comercial.

2. MÉTODOS

2.1. Preparo das soluções

2.1.1. Soluções padrão estoque e intermediárias utilizadas no CLAE-EM/EM

As massas teóricas de cada padrão de neomicina e gentamicina (considerou-se como padrão único a mistura das gentamicinas) foram pesadas separadamente, dissolvidas em 4 mL metanol grau cromatográfico, e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com água ultrapura para o preparo das soluções estoque na concentração nominal de 1000 µg/mL, calculadas considerando as correções de pureza. As soluções estoque foram transferidas para frascos e estocadas em freezer.

As massas teóricas de cada padrão de clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e sulfafenazol foram pesadas separadamente, dissolvidas em metanol grau cromatográfico, e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL para

o preparo das soluções estoque na concentração nominal de 1000 µg/mL calculadas considerando as correções de pureza. As soluções estoque foram transferidas para frascos e estocadas em freezer.

As massas teóricas de cada padrão de enrofloxacino, ciprofloxacino e norfloxacino foram pesadas separadamente, dissolvidas em 4 mL hidróxido de sódio 0,1 N e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com água ultrapura para o preparo das soluções estoque na concentração nominal de 1000 µg/mL calculadas considerando correções de pureza. As soluções estoque foram transferidas para frascos e estocadas freezer.

As soluções intermediárias dos padrões de clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, gentamicina mista, neomicina, enrofloxacino, ciprofloxacino e norfloxacino na concentração 50 µg/mL foram preparadas transferindo 1250 µL de cada solução estoque separadamente para balões de 25 mL e o volume completado com água ultrapura. As soluções intermediárias foram transferidas para frascos e estocadas freezer.

As soluções do pool de trabalho dos padrões (clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, gentamicina, neomicina, enrofloxacino, ciprofloxacino e norfloxacino) para a determinação da curva analítica, do efeito matriz e da exatidão em concentrações variadas foram preparadas transferindo volumes variados de cada solução intermediária de 50 µg/mL para tubos de 15 mL e o volume completado com água ultrapura para 10 mL. As concentrações variaram nas seguintes faixas: 0,03 µg/mL a 1,8 µg/mL para tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e norfloxacino; de 0,03 µg/mL a 2,0 µg/mL para enrofloxacino, ciprofloxacino e doxiciclina; de 0,5 µg/mL a 6,0 µg/mL para neomicina; e de 0,5 µg/mL a 6,5 µg/mL para gentamicina total. As soluções foram estocadas em freezer.

A solução intermediária de sulfafenazol (padrão interno) de 2 µg/mL foi preparada transferindo 50 µL da solução estoque para balão de 25 mL e o volume foi completado com água ultrapura. A solução intermediária foi transferida para frasco e estocada freezer.

2.1.2. Soluções padrão estoque e intermediárias utilizadas no kit tetraciclina

A massa teórica de tetraciclina foi pesada, dissolvida em metanol grau cromatográfico, e transferida quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL para o preparo da solução estoque na concentração nominal de 1000 µg/mL calculada

considerando a correção de pureza. A solução estoque foi transferida para frasco e estocada em freezer.

Solução padrão intermediária de tetraciclina em leite controle na concentração de 5 µg/mL foi preparada transferindo 125 µL da solução padrão estoque de tetraciclina (1 mg/mL) para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com leite controle (Skim Milk). A solução intermediária foi transferida para frasco e estocada em freezer.

A solução padrão intermediária de tetraciclina em leite controle na concentração de 60 ng/mL foi preparada transferindo 120 µL da solução intermediária de tetraciclina (5 µg/mL) para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com leite controle (Skim Milk). A solução intermediária foi transferida para frasco e estocada em freezer.

Solução padrão intermediária de tetraciclina em leite controle na concentração de 40 ng/mL foi preparada transferindo 80 µL da solução intermediária de tetraciclina (5 µg/mL) para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com leite controle (Skim Milk). A solução intermediária foi transferida para frasco e estocada em freezer.

Solução padrão intermediária de tetraciclina em leite controle na concentração de 30 ng/mL foi preparada transferindo 60 µL da solução intermediária de tetraciclina (5 µg/mL) para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com leite controle (Skim Milk). A solução intermediária foi transferida para frasco e estocada em freezer.

2.1.3. Outras soluções

Foram transferidos 1000 µL do ácido pentafluoropropiônico para balão de 1 L e o volume foi completado com água ultrapura para uma concentração final de 0,1%. A solução foi transferida para um frasco âmbar (Fase móvel A).

Solução de metanol : ACN (1 : 9) foi preparada adicionando 100 mL de metanol e 900 mL de ACN grau cromatográfico em uma proveta e transferida para um frasco de vidro (Fase móvel B).

Solução de ácido TCA a 5% foi preparada pesando 5,0 g ácido tricloroacético, dissolvendo em água ultrapura e transferindo para um balão de 500 mL. A solução foi armazenada em frasco em geladeira (Fase de extração).

Solução de hidróxido de sódio 0,1 N foi preparada pesando-se 0,4 g NaOH em um béquer e dissolvido em água ultra pura para balão volumétrico de 100 mL. A solução foi transferida para um frasco e estocada em geladeira.

2.2. Análise qualitativa de tetraciclinas em leite

Para a análise qualitativa (**screening**) das tetraciclinas nas amostras de leite foi utilizado o Kit SNAP tetraciclinas e o procedimento foi realizado como descrito no manual do kit IDEXX Laboratories (2007). Anteriormente às análises, foi preparada uma amostra controle e foi confirmado o limite de detecção do kit.

2.2.1. Preparo da amostra de leite controle para análise no kit SNAP

Foi pesado (10 g) leite em pó desnatado (*Skim Milk*). Este foi dissolvido em aproximadamente 40 mL de água ultrapura e colocado em banho-maria a 35 ± 5 °C por cerca de 30 minutos, misturando de vez em quando com bastão de vidro. No caso de dificuldade na dissolução, a amostra foi levada a banho ultrassom por 15 minutos. A solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, o volume foi completado e a solução foi homogeneizada.

2.2.2. Confirmação do limite de detecção do kit SNAP

O limite de detecção do kit SNAP foi determinado a cada lote. Foram utilizados leite controle (*Skim Milk*) e leite controle adicionado do padrão de tetraciclina em diferentes concentrações em triplicata, de 60 ng/mL, 40 ng/mL, 30 ng/mL e diluições destas até obter uma leitura negativa.

2.2.3. Análise das amostras de leite pelo kit SNAP tetraciclinas

De acordo com instrução do fabricante, o SNAP foi colocado no bloco aquecedor, e foi adicionado ao tubo 450 ± 50 µL da amostra de leite utilizando a pipeta dosadora do kit, sendo o tubo agitado até a solubilização da pastilha reagente. O tubo de amostra foi incubado no bloco aquecedor pré-aquecido a 45 ± 5 °C por 5 minutos. Todo o conteúdo do tubo de amostra foi vertido no dispositivo de prova do SNAP (Figura 5), sendo descartado o tubo. A amostra fluiu através do dispositivo para o círculo rosa de ativação. Quando este círculo começou a desaparecer, o ativador foi empurrado firmemente até o dispositivo ficar com o corpo nivelado com o SNAP. Após exatamente 4 minutos de repouso, os resultados foram lidos (IDEXX Laboratories, 2007).

Cada batelada de amostra foi acompanhada por um ponto negativo (leite controle Skim Milk) e um ponto positivo (solução padrão de tetraciclina em leite controle, na concentração de 40 ng/mL).



Figura 5 - Esquema demonstrando utilização do kit SNAP.
Fonte: IDEXX Laboratories (2007).

2.3. Análise quantitativa de aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas por CLAE-EM/EM

2.3.1. Preparo das amostras de leite para análise

As amostras de leite líquido resfriadas ou congeladas foram aquecidas em banho-maria na faixa de 35 ± 5 °C até a temperatura ambiente, agitando a embalagem manualmente para que a gordura não fique separada.

O leite em pó foi pesado (13 g) e dissolvido em aproximadamente 40 mL de água ultrapura e deixado no banho-maria com ultrassom a 35 ± 5 °C por cerca 30 minutos, agitando de vez em quando com bastão de vidro. O conteúdo foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água ultrapura, homogenizado e transferido para frascos devidamente identificados. As amostras foram imediatamente analisadas.

O método de multirresíduos para aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclinas por CLAE-EM/EM foi desenvolvido conforme descrito pela AFSSA (2010) com algumas modificações nos parâmetros do espectrômetro de massas, quanto à coluna e o gradiente de eluição para a CLAE.

2.3.2. Otimização da análise no espectrômetro de massas

A otimização do espectrômetro de massas foi realizada pela infusão direta de cada padrão de antibiótico em ACN : ácido fórmico a 0,1% (1:1) no espectrômetro de massas nas concentrações de 50 a 200 ng/mL, conforme sugerido no manual de operação do 4000 QTrap no modo Multiple Reaction Monitoring (MRN - Monitoramento de Reações Múltiplas), visando à determinação do íon precursor e dos fragmentos ótimos, representados no Apêndice A.

As soluções foram introduzidas no espectrômetro por infusão direta com bomba em seringa Harvard a um fluxo de 10 µL/min. A seguir foi realizada a análise de injeção de fluxo (FIA) de cada padrão de antibióticos em ACN : ácido fórmico a 0,1% (1:1), nas concentrações de 5 a 20 ng/mL, visando otimizar os parâmetros da fonte de íons (gases, voltagem do ion spray, temperatura), potencial de declustering (DP), potencial de energia de entrada (EP), energia de colisão (CE) e potencial de colisão da célula de saída e as transições (Q1 massa/Q3 massa).

2.3.3. Otimização das condições no CLAE

Após o estabelecimento das condições de trabalho do espectrômetro de massas foram realizados testes com colunas, gradientes de eluição e de fluxo para estabelecer as melhores condições analíticas para separação no CLAE.

2.3.4. Extração de antibióticos das amostras

Para extração dos antibióticos das amostras, alíquotas de 1 mL de cada amostra de leite, em duplicata, foram transferidas para os tubos de ultracentrifuga, os quais foram adicionados de 50 µL de água ultrapura e de 50 µL do sulfafenazol de 2 µg/mL (padrão interno) e agitados em vortex por 10 segundos. Após, foram adicionados 3,9 mL de TCA 5%, e o tubo foi homogeneizado em vortex e centrifugado a 43.300 g a 4 °C por 10 minutos. As amostras foram filtradas em seringas conectadas em membranas filtrante de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro para vials de vidro com tampa e injetadas no CLAE-EM/EM nas condições analíticas estabelecidas.

2.3.5. Validação do método analítico no CLAE-EM/EM

Os parâmetros de desempenho do método foram estabelecidos por procedimento intralaboratorial com soluções padrões, amostras brancas (leite controle fornecido pelo LANAGRO) e amostras adicionadas de padrões. Foram avaliados os critérios de desempenho do método - linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão,

limites de detecção e quantificação experimentais e limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Os resultados foram avaliados segundo os critérios de aceitabilidade de cada parâmetro de validação do método analítico, empregando testes estatísticos com nível de significância de $\alpha=0,05$ (THOMPSON, 2000; BRITO et al., 2002; EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; ANTIGNAC et al., 2003; BRASIL, 2003a; BRITO et al., 2003; ABNT, 2005; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007; CUNHA, 2009; INMETRO, 2011).

Seletividade. A seletividade do método foi avaliada analisando amostras brancas, amostras adicionadas de pool de padrões (clortetraciclina, tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina gentamicina, neomicina, enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino e sulfafenazol como padrão interno), branco de reagentes e pool de padrões em solvente, e injetadas no CLAE-EM/EM de acordo com as condições estabelecidas (EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; BRASIL, 2003a; BRITO et al., 2003; ABNT, 2005; INMETRO, 2011).

Linearidade. A curva de calibração foi preparada a partir das soluções padrões para obter as concentrações de 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 e 18,0 ng/mL para tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina e norfloxacino; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 e 20,0 ng/mL para enrofloxacino, ciprofloxacino e doxiciclina; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0; 50,0; 55,0 e 60,0 ng/mL para neomicina; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0; 45,0; 50,0; 55,0; 60,0 e 65,0 ng/mL para gentamicina total, sendo que gentamicina C1a, C1 e C2+C2a correspondem, respectivamente, a 26%, 27% e 47%. As diferentes concentrações foram preparadas adicionando, em um tubo contendo 1 mL de água ultrapura, 50 μ L do pool dos padrões para obter as concentrações especificadas, 50 μ L padrão interno de sulfenazol (pi) na concentração de 2 μ g/mL e 3,9 mL de TCA 5%. Cada ponto foi injetado no CLAE-EM/EM de acordo com as condições estabelecidas em quadruplicata independente e as leituras foram feitas em ordem aleatória (EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; BRASIL, 2003a; BRITO et al., 2003; ABNT, 2005; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2011).

Efeito matriz. O efeito matriz foi avaliado pelo método de adição, preparando, no mesmo dia, duas curvas: uma da solução padrão dos antibióticos em solvente e a outra dos extratos da amostra de leite controle (curva matrizada) preparados pipetando 1 mL

de leite em um tubo de centrifuga, adicionando 3,9 mL de TCA a 5% e centrifugados a 43.300 g a 4 °C por 30 min. Do sobrenadante foi pipetado 2,4 mL para um tubo falcon e adicionado de 25 µL do padrão interno e 25 µL do pool de padrões nas faixas de concentração de 5,4 a 14,85 ng/mL para gentamicina C1; de 5,2 a 13,0 ng/mL para gentamicina C1a; de 5,0 a 25,0 ng/mL para neomicina; de 0,3 a 16,0 ng/mL para norfloxacino e clortetraciclina; de 0,3 a 14 ng/mL para enrofloxacino, ciprofloxacino e doxiciclina; de 0,3 a 10 ng/mL para tetraciclina; e de 0,3 a 18 ng/mL para oxitetraciclina. A seguir, foram agitados em vórtex e filtrados. Cada nível de concentração foi preparado em quadruplicata independente e as leituras feitas em ordem aleatória. Em cada curva foi comprovada a normalidade dos resíduos ($\alpha = 0,05$), homocedasticidade das variâncias dos resíduos das curvas pelo teste de F e ajuste do modelo linear. Após a determinação da homoscedasticidade e/ou heteroscedasticidade das curvas pelo teste de F , foram avaliadas as inclinações e as interseções pelo teste de t ($\alpha = 0,05$) utilizando variâncias combinadas e/ou distintas em função da homoscedasticidade e/ou heteroscedasticidade dos resíduos das curvas (EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; BRASIL, 2003a; BRITO et al., 2003; ABNT, 2005; SOUZA, 2007; INMETRO, 2011).

Exatidão e precisão. Para exatidão, repetitividade e reprodutibilidade foram preparadas amostras adicionadas e sem adição de padrão dos analitos, nos níveis de concentração da faixa de linearidade e analisadas independentemente em condições de reprodutibilidade parcial (diferentes dias); e com as leituras feitas em ordem aleatória junto com a curva de calibração (THOMPSON, 2000; BRITO et al., 2002; EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; BRASIL, 2003a; BRITO et al., 2003; ABNT, 2005; SOUZA, 2007; CUNHA, 2009; INMETRO, 2011).

Limites de detecção e quantificação. Os limites de detecção e de quantificação do método (LD e LQ) foram estabelecidos baseados nos resultados da recuperação média e desvio-padrão obtidos das amostras adicionadas de padrão. Para o LD foi considerada a concentração mais baixa do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado e diferente de zero (sinal/ruído ≥ 3) e o LQ a concentração abaixo da qual o método não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003a; BRITO et al., 2003; CUNHA, 2009; INMETRO, 2011).

Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). O limite de decisão ($CC\alpha$) foi determinado pela probabilidade da amostra analisada ser conforme apesar

de se ter obtido um resultado não conforme. A capacidade de detecção ($CC\beta$) foi determinada pela probabilidade da amostra analisada ser na realidade não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme. O $CC\alpha$ e o $CC\beta$ foram calculados utilizando os resultados dos ensaios de precisão e exatidão (EC, 2002; ANTIGNAC et al., 2003).

2.3.6. Análise de antibióticos em leite por CLAE-EM/EM

O método otimizado e validado foi utilizado para quantificar antimicrobianos em amostras de leite coletadas em diversas regiões do Brasil. Os resultados obtidos foram agrupados em função do tipo de leite e local de coleta.

2.4. Análise estatística

As amostras foram avaliadas estatisticamente considerando os resíduos de antibióticos encontrados nas amostras e o percentual coletado em cada região do país (Centro oeste, Nordeste, Norte, Sudeste e Sul) como em relação ao tipo de leite (pasteurizado, UHT, em pó). Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e os resultados obtidos foram comparados com os encontrados na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. TRIAGEM DE AMOSTRAS DE LEITE DE MINAS GERAIS NO KIT SNAP PARA TETRACICLINAS

O limite de detecção do kit SNAP para análises de tetraciclina foi de 30 µg/L, sendo este valor abaixo do preconizado no manual do kit que é de 50 µg/L (IDEXX Laboratories, 2007).

No ensaio de triagem foi estabelecida a utilização de um controle positivo, que consistiu do *Skim milk* adicionado de padrão de tetraciclina na concentração de 40 µg/L, conforme orientação do manual do kit, que recomenda a utilização de um controle positivo acima do limite de detecção encontrado (IDEXX Laboratories, 2007), e de um controle negativo com resultado abaixo do limite de detecção do kit, evidenciando a sua utilização como amostra de leite controle nos ensaios de triagem.

Dentre as 120 amostras do Estado de Minas Gerais avaliadas quanto à presença de tetraciclina, 25 eram de leite em pó; 38 de leite UHT; e 57 de leite pasteurizado. Todas as amostras apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do kit (30 µg/L), evidenciando que as amostras estavam conformes, tendo em vista que o máximo de resíduo para o somatório das tetraciclina deve ser de 100 µg/L (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina) (BRASIL, 2012).

Os resultados obtidos neste estudo indicam a qualidade das amostras de leite analisadas em relação aos antimicrobianos da classe das tetraciclina. Este resultado é desejável sugerindo que a qualidade do leite no estado de Minas Gerais esta adequada com relação a estes antimicrobianos. De acordo com Moraes et al. (2010), dentre 57 amostras de leite pasteurizado tipos B e C comercializado no Rio de Janeiro e analisadas com o Kit SNAP, 54,5% apresentaram resíduos de tetraciclina acima do limite de detecção do kit (20 µg/L), limite este abaixo do encontrado neste estudo. De 312 amostras analisadas pelo PAMvet em 2004-2005 para triagem de tetraciclina, 21 amostras (7%) apresentaram resultado positivo para antibióticos da classe das tetraciclina, sendo seis (2%) em leite UHT, e 15 (48%) em leite em pó, porém não foi realizada a análise confirmatória destes por CLAE/UV e/ou CLAE-EM/EM (ANVISA, 2006). Estes resultados podem ser devido ao LD do kit utilizado que foi na faixa de 5 a 20 µg/L, abaixo do encontrado nesta pesquisa.

2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CLAE-EM/EM

A técnica de espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência tem sido cada vez mais utilizada na confirmação de resíduos de contaminantes em alimentos, matrizes biológicas e ambientais. O modo de aquisição Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) é o mais adequado para a quantificação por sua maior sensibilidade e especificidade. A escolha das transições de MRM deve basear-se em fragmentações que forneçam informações características, preferencialmente de partes distintas das moléculas. Assim, para a obtenção das transições de MRM foi feita uma otimização automática do equipamento de forma a gerar cinco transições para posterior seleção das três mais intensas.

Na infusão direta no espectrômetro de massas, a presença dos antibióticos foi confirmada pela varredura no quadrupolo Q1 (Q1Scan) (Apêndice A, figuras 1a a 11a), para uma faixa de massas m/z 500 a 1000 Da. Os íons mais abundantes e seus íons produtos estabelecidos (Tabela 5) corresponderam aos citados pela AFSSA (2010), exceto para a gentamicina. A gentamicina consiste de uma mistura de 27% de C_1 , 26% de C_{1a} e 47% de $C_2 + C_{2a}$, sendo que C_2 e C_{2a} não ionizaram em nenhuma transição, isto pode ser devido ao padrão utilizado que não especifica a quantidade real da massa das mesmas. Portanto foi utilizada apenas a gentamicina C_1 e C_{1a} neste trabalho considerando a proporção das mesmas. No Apêndice A, figuras 1b a 11b, estão apresentados os espectros de massas dos produtos ótimos de cada antibiótico.

A maior transição Q1/Q3 da neomicina foi 615,3/161 em vez de 615,3/163. Isto pode ser atribuído às pequenas variações na energia da célula de colisão (CE) e no *declustering potential* (DP) em relação àquelas utilizadas pelo AFSSA (2010).

A análise de injeção de fluxo dos padrões de antibióticos não apresentou diferenças em relação aos resultados obtidos na infusão direta para o íon de maior abundância e seus íons produtos para os antibióticos pesquisados.

As melhores condições estabelecidas para o espectrômetro de massas e para os parâmetros da fonte estão discriminadas nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Os resultados obtidos para a quebra do íon precursor em Q₁ e dos produtos de transição em Q₃ estão de acordo com o método desenvolvido pelo Laboratoire D'études et de Recherches Sur Les Médicaments Vétérinaires et Les Désinfectants (AFSSA, 2010). Entretanto as energias de *Declustering Potential* (DP), *Energy Potential* (EP), *Collision*

Cell (CE) e *Collision Cell Exit Potential* (EXP) tiveram variações desprezíveis, atribuídas a diferenças de modelo dos equipamentos utilizados.

Tabela 5 - Transições monitoradas e parâmetros do espectrômetro no *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), de Q1/Q3 com as energias de *Declustering Potential* (DP), *Energy Potential* (EP), *Collision Cell* (CE), *Collision Cell Exit Potential* (EXP) e Tempo de Retenção Relativo (TR)

Substância	PM (g/mol)	TR (min.)	Íon Precursor [M + 1] ⁺ Q ₁ (DA)	Produtos de transição Q ₃ (DA)	DP (V)	EP	CE (V)	EXP (V)
Oxitetraciclina	460,5	4,4	461,2	426,2 443,2 443,6	51	10	27 19 21	30 12 12
Gentamicina C1	477,6	4,5	478,3	322,1 157,0 160,0	106	10	21 29 33	22 8 10
Gentamicina C1A	449,6	4,5	450,3	322,1 160,0 163,0	81	10	21 31 31	22 10 10
Neomicina	614,5	4,5	615,3	161,0 163,0 455,2	126	10	43 53 33	10 10 12
Ciprofloxacino	331,3	4,6	332,1	314,2 231,2 290,9	51	10	13 29 29	20 28 28
Norfloxacino	319,3	4,6	320,1	302,1 276,0 231,0	76	10	29 25 55	18 14 14
Enrofloxacino	359,4	4,8	360,2	231,0 316,3 245,2	66	10	31 27 37	22 22 16
Tetraciclina	444,4	4,8	445,3	410,0 427,1 154,0	71	10	25 19 39	42 10 8
Clortetraciclina	478,9	5,2	479,1	444,1 462,1 154,1	71	10	29 25 41	30 32 8
Doxiciclina	444,4	5,3	445,1	428,2 154,1 267,1	56	10	31 41 49	32 8 16
Sulfafenazol (padrão interno)	314,4	5,9	315,1	158	50	10	52	11

Tabela 6 - Condições dos parâmetros da fonte do espectrômetro de massas

Parâmetro	Valor
Ionização	Turbo <i>ion spray</i>
Cortina de gás (CUR)	20 psi
Gás de colisão (CAD)	Medio
Voltagem da <i>Ion Spray</i> (IS)	4500 v
Ciclos	1013 seg
Tempo de atraso	0 seg
<i>Ion Souce Gas 1</i> (GS1)	45 psi
<i>Ion Souce Gas 2</i> (GS2)	50 psi
Temperatura (T)	500 °C
Polaridade	Positivo
Janela de detecção do MRM	60 seg

No desenvolvimento cromatográfico inicialmente foi utilizado ácido acético a 0,1% em água (fase móvel A) e metanol e/ou acetonitrila (fase móvel B), coluna C₁₈ Lichrospher de 100 mm x 4,0 mm, partícula de 5 µm, fluxo de 0,5 mL/min e sistema de eluição isocrático que não possibilitou a identificação de todos os analitos. A utilização da coluna Nucleodur da MN, C₁₈ de 150 mm x 4,0 mm, partícula de 5 µm, com ácido pentafluorpropionico 0,1% (fase móvel A), acetonitrila e metanol (9:1) (fase B) e gradiente de fase e de fluxo permitiu a separação, identificação e quantificação de todos os íons. As condições analíticas ideais para a separação por CLAE são:

- Temperatura do forno da coluna à 40 °C;
- Coluna Nucleodur da MN C₁₈, de 150 mm x 4 mm e 5 µm de partícula;
- Pré-coluna da Merck C₁₈, 4 mm x 4 mm;
- Volume injetado de 100 µL;
- Fase móvel e fluxo por gradiente de eluição conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Gradiente de eluição da fase móvel e de fluxo para as condições analíticas de separação dos antibióticos das classes aminoglicosídeos, fluoroquinolanas e tetraciclina por CLAE

Gradiente de eluição/fase móvel			Gradiente de fluxo	
Tempo (min)	Conc. A (%)	Conc. B (%)	Tempo (min.)	Fluxo total (mL/min)
0,01	75	25	0,01	0,5
7,0	35	65	4,0	0,5
11,0	35	65	4,50	0,8
12,0	75	25	8,0	0,8
17,0	75	25	8,5	0,5

Na figura 6 está apresentado o cromatograma com os fragmentos de quantificação dos antibióticos em solvente. E no Apêndice A (Figuras 1c a 11c) estão os cromatogramas dos padrões em solvente do pico de quantificação e dos picos de confirmação dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfafenazol na m/z de cada fragmento correspondente. O sulfafenazol apresenta apenas pico de quantificação por ser utilizado como padrão interno.

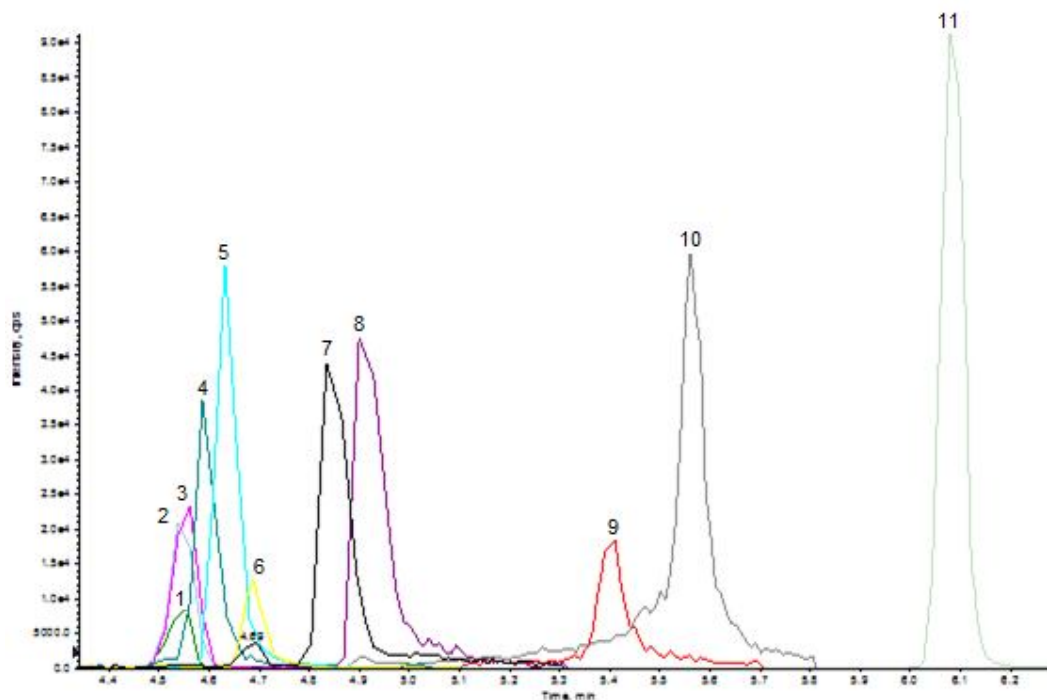


Figura 6 - Perfil cromatográfico do padrão em solvente na m/z dos fragmentos de quantificação dos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfafenazol.

Nota: aminoglicosídeos (1 e 3 - gentamicina C_{1a} e C_1 , 2 - Neomicina), fluoroquinolonas (4 - norfloxacin, 6 - ciprofloxacina, 8 - enrofloxacin), tetraciclina (5 - oxitetraciclina, 7 - tetraciclina, 9 - clortetraciclina, 10 - doxiciclina), 11 - sulfafenazol.

3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO CLAE-EM/EM

O leite controle (*Skim Milk* - DIFCO) utilizado no kit SNAP para tetraciclina foi submetido ao processo de extração das amostras e injetado no CLAE-EM/EM nas condições estabelecidas. Os resultados mostraram a presença de picos na região de interesse dos antibióticos para os resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, neomicina e gentamicina C_1 e C_{1a} . Desta forma, este não pôde ser utilizado como amostra de leite controle nas análises por CLAE-EM/EM.

Várias amostras de leite cru de procedências conhecidas (diferentes regiões e fazendas de Minas Gerais), de vacas leiteiras distintas que nunca haviam sido submetidas ao tratamento com antibiótico, segundo informação dos produtores, foram pesquisadas. Estas amostras apresentaram resíduos de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina e neomicina), exceto o leite fornecido pelo LANAGRO/Pedro Leopoldo. Possivelmente, a presença desses resíduos no leite pode ser atribuída ao meio ambiente (água e solo) uma vez que a alimentação do gado era composta de capim, cana de açúcar e sal ou pode ter sido realmente tratados com antibióticos. O leite fornecido pelo LANAGRO/Pedro Leopoldo uma vez que não possuía resíduos de antibióticos foi utilizado como amostra branco e para realização da validação.

3.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada qualitativamente pela inspeção visual do perfil cromatográfico e dos espectros de massas do branco do leite controle, do branco de reagentes, dos padrões em solvente, e do branco de leite controle adicionado de padrões depois de submetido à extração. Ao comparar a resposta do branco do leite controle extraído e do branco de reagente em relação à resposta dos padrões de antibióticos em solvente, não foram detectados analitos na região dos antibióticos avaliados, uma vez que a relação sinal/ruído dos brancos do leite controle e dos reagentes foi menor que 3, conforme recomendado pelo INMETRO (2011). Ainda, não foi observada a presença de compostos de relação m/z de mesma transição e tempos de retenção iguais aos dos antibióticos analisados.

No perfil da amostra de leite controle adicionada dos antibióticos, quando comparada com o dos padrões em solvente, pode-se observar a presença de compostos de relação m/z de mesma transição e tempos de retenção iguais aos dos antibióticos analisados. Os resultados mostraram que o método foi seletivo, visto que os antibióticos foram detectados nas amostras adicionadas, em níveis acima do limite de detecção do método ($\text{sinal/ruído} \geq 3$) para tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolona, quando comparado com o da amostra controle (branca) ou o branco dos reagentes. A avaliação dos cromatogramas dos aminoglicosídeos apontou que as intensidades dos picos foram menores em relação aos das tetraciclina e fluoroquinolonas indicando sua baixa ionização. Contudo, maiores concentrações não podem ser utilizadas, porque ocorreu supressão entre eles quando concentrações maiores foram usadas.

A intensidade dos fragmentos da massa/carga (m/z) selecionada para as tetraciclina, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos apresentou uma boa resolução evidenciando que não ocorreu interferência da matriz. Na Figura 7 esta apresentada a comparação dos perfis cromatográficos do branco de reagente extraído, padrão em solvente, e branco do leite controle extraído com e sem fortificação.

Foi observado no scan da clortetraciclina (Apêndice A, Figura 10c) dois fragmentos de identificação com mesma m/z , mas tempo de retenção diferentes, sugerindo que um deles seja epímero da clortetraciclina (4-epiclortetraciclina).

De acordo com as legislações da UE (2010), do Brasil (2012) e do Codex Alimentarius (2015), os resultados para tetraciclina (clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina), devem se referir ao somatório das tetraciclina juntamente com o epímero correspondente de cada uma e para gentamicina é a soma de C_1 , C_{1a} , C_2 e C_{2a} . Entretanto, neste trabalho, não foi possível validar os epímeros das tetraciclina e gentamicina C_2 e C_{2a} , uma vez que não tínhamos padrão. Estas substâncias serão validadas posteriormente para atender aos critérios da legislação.

3.2. Linearidade

Na avaliação dos dados de linearidade foram consideradas as padronizações externa (PE) e interna (PI). Os valores discrepantes dos pontos das curvas de calibração dos padrões em solventes foram avaliados pelo método dos resíduos padronizados de Jackknife (J_{ei}) e estes seguiram distribuição de $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$, sendo retirados os pontos que apresentaram valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico (t_{vc}) (BRASIL, 2003a; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; CUNHA, 2009; INMETRO, 2011).

As exclusões dos valores extremos de resíduos foram feitas de modo que permanecessem dentro dos 22% do número original de resultados (BELSLEY et al., 1980; HORWITZ, 1995). Quando os níveis foram avaliados, levando em consideração a retirada de no máximo $22\% \pm 0,5\%$ para as substâncias analisadas, o número de níveis para a PI foi maior que para PE, exceto para neomicina e doxiciclina cujos números de níveis foram similares. Os percentuais de retirada de valores discrepantes variaram de 0% a 21,4% e de 0% a 22,5% respectivamente para PE e PI. Entretanto, o percentual de retiradas de pontos foi maior na PI do que na PE, exceto para a tetraciclina (21,4%) que foi retirado um maior percentual de pontos. A faixa de concentração depois da retirada dos valores extremos foram maiores na PI, exceto para clortetraciclina e doxiciclina que foram maiores e a neomicina que foi similar (Apêndice B Tabelas 1 a 5)

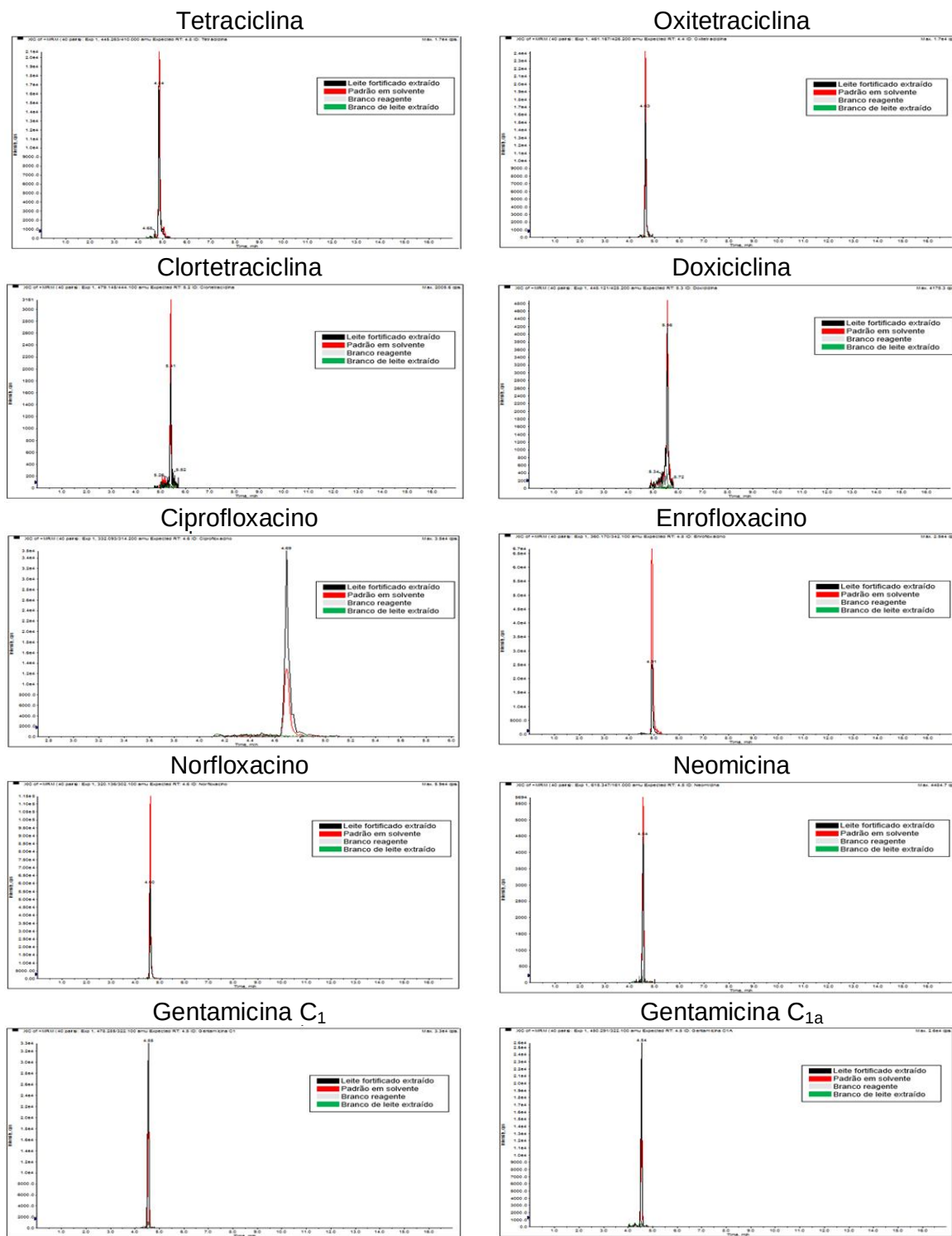


Figura 7 - Comparação dos perfis cromatográficos do leite fortificado, padrão em solvente, branco de reagentes e branco de leite na m/z dos fragmentos dos antibióticos.

Os resíduos da curva de calibração dos padrões em solvente para ambas PE e PI seguiram a distribuição normal, pois os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner (R_{vc}), foram maiores do que os valores $R_{crítico}$ (R_c) (Apêndice B Tabelas 1 a 5).

A independência entre os resíduos das curvas de calibração dos antibióticos foi avaliada pelo teste estatístico de Durbin-Watson. A distribuição homogênea dos níveis de concentrações das curvas de calibração nos quatro quadrantes não apresentaram tendências negativas ou positivas. Os valores estatísticos calculados para ambas as curvas encontram-se discriminados no Apêndice B, permanecendo dentro do critério de aceitabilidade $du \rightarrow d \leftarrow 4-du$, confirmando que não há autocorrelação positiva ou negativa para $p > 0,1$ para todos os analitos.

A variabilidade dos resíduos da regressão para as curvas de calibração em solvente tanto para PE e PI foi realizada pelo teste de Levene modificado e os resultados mostraram que os valores de t Levene calculado (t_{Lc}) foram menores que o t tabelado ($t_{0,975}$), concluindo que a variação entre os resíduos em cada nível de concentração não foi significativa para $p > 0,05$ (Apêndice B Tabelas 1 a 5), evidenciando a homocedasticidade (LEVENE, 1960; BROWN & FORSYTHE, 1974; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

A avaliação da regressão linear foi realizada pela análise de variância (ANOVA). Os valores dos coeficientes de regressão linear (r^2) da curva de calibração de cada antibiótico em solvente estão discriminados no Apêndice B (Tabelas 1 a 5) e variaram de 0,8930 a 0,9995 para PE e de 0,9366 a 0,9947 para PI evidenciando a sua adequacidade e a possibilidade de estimativas confiáveis. Foi utilizado o teste de F para avaliar a significância da regressão linear e a falta de ajuste para as curvas dos padrões de antibióticos em solventes na PE e PI. Os resultados evidenciaram a existência de uma relação linear entre as variáveis x e y para ambas as curvas de calibração, uma vez que a probabilidade calculada da regressão (p_{cr}) é muito menor que a crítica ($p < 0,001$) (Apêndice B). Não há desvio da linearidade para as curvas padrões na PE e PI, pois a probabilidade calculada para a falta de ajuste (p_{fa}) é maior que a probabilidade crítica ($p > 0,05$), exceto para a gentamicina C1a, norfloxacin e tetraciclina na PE cujos p_{fa} foram 0,002, 0,018 e 0,04, respectivamente (Apêndice B Tabelas 1 a 5). A falta de ajuste não impactou nos resultados, tendo em vista a alta significância da regressão linear ($p < 0,001$). Ao considerar p crítico igual a 0,001, pode-se concluir que não existe falta de ajuste para nenhum dos antibióticos tanto na PE como na PI.

Todos os testes estatísticos utilizados para avaliar as curvas de calibração em solvente na PE e PI mostraram que são lineares. As figuras 8 e 9 mostram os gráficos da linearidade da PE e PI dos antibióticos em solvente com suas respectivas equação da reta.

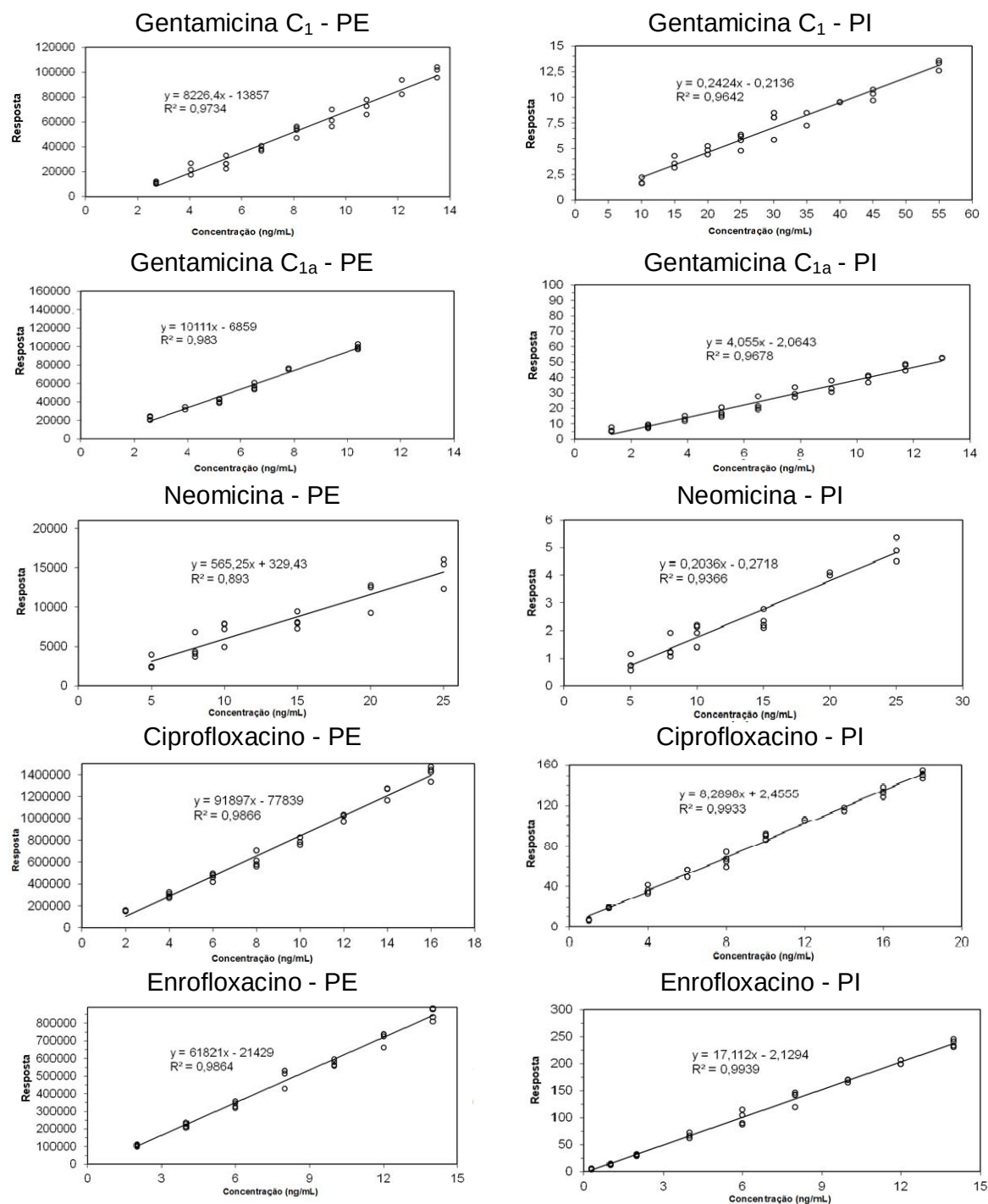


Figura 8 - Gráficos da linearidade da PE e PI em solvente da Gentamicina C₁, Gentamicina C_{1a}, Neomicina, Ciprofloxacin e Enrofloxacin.

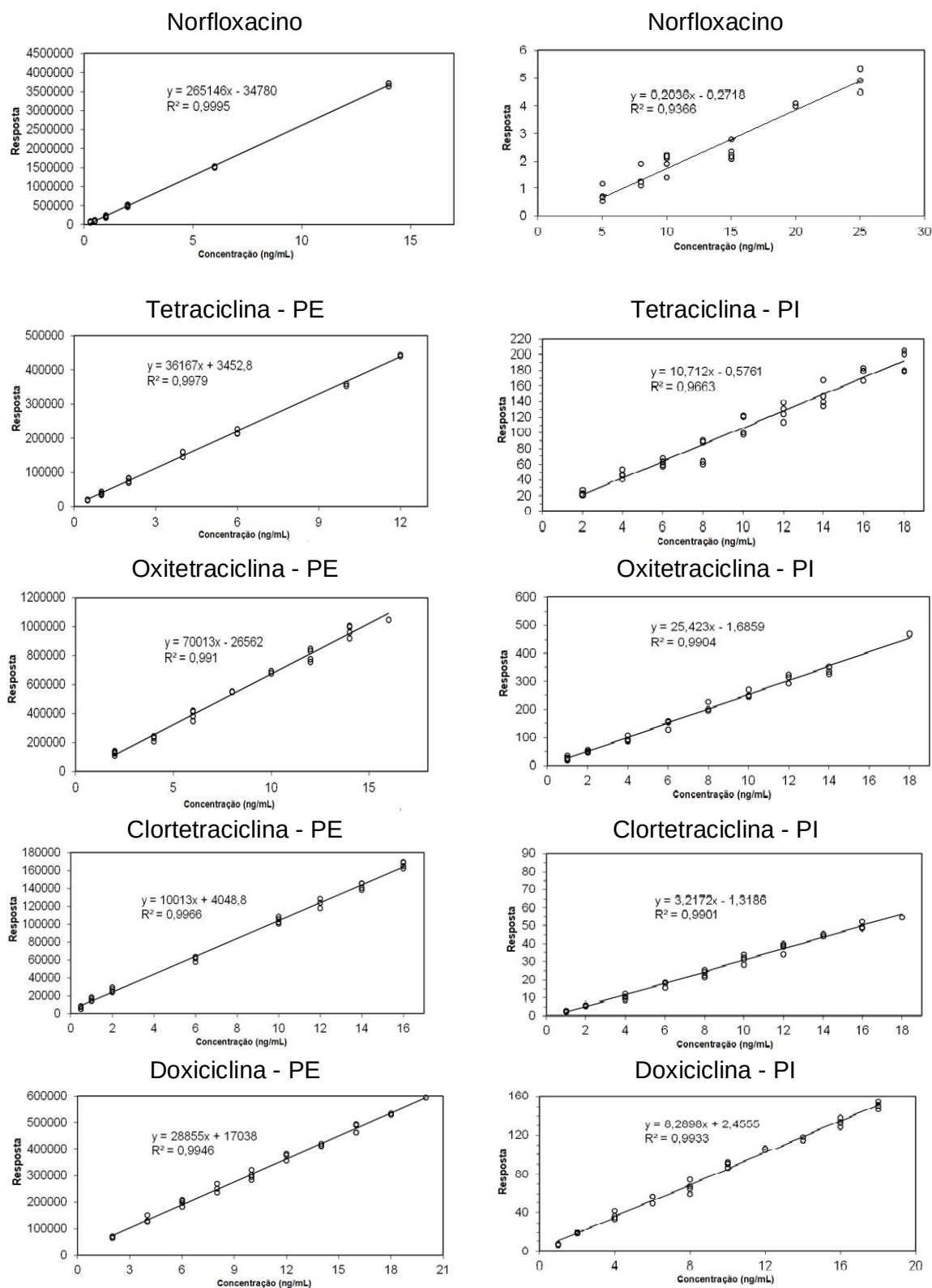


Figura 9 - Gráficos da linearidade da PE e PI em solvente do Norfloxacin, Tetraciclina, Oxitetraciclina Clortetraciclina e Doxiciclina.

3.3. Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado pela elaboração das curvas analíticas de padrões em solventes e outra com adição de padrão na matriz. Para a análise dos dados foi utilizado os mesmos testes estatístico da linearidade. Estes evidenciaram que, nas duas curvas, os resíduos seguiram a distribuição normal, não houve autocorrelação entre os resíduos, estes foram homocedásticos, a regressão foi significativa ($p < 0,001$), não foi observada falta de ajuste ($p > 0,05$) e os valores discrepantes não ultrapassaram $22 \pm 0,5\%$. A comparação entre a curva analítica dos padrões em solventes e em matriz foi realizada pela análise das variâncias de seus resíduos e os resultados mostraram que foram heterogêneas para enrofloxacin, ciprofloxacino e clortetraciclina e homogêneas para gentamicina C_{1a} . Para gentamicina C_1 , neomicina, norfloxacin, doxiciclina, tetraciclina e oxitetraciclina foram homogêneas ou heterogêneas para PE ou PI pelo teste F ($p > 0,05$), conforme descrito no Apêndice C (Tabelas 1 a 3). Uma vez que a variância dos resíduos nas duas curvas de calibração quando comparadas, foi considerado homogêneo ou heterogêneo, o teste de hipótese para a inclinação e o intercepto foi realizado pelo cálculo de t considerando as variâncias combinadas e distintas, respectivamente. Os resultados estão apresentados no Apêndice C (Tabelas 1 a 3) e indicaram que existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as curvas de calibração do efeito matriz dos antibióticos e a curva padrão em solvente visto que o $t_{cal} > t_{tab}$ para as inclinações, exceto para a gentamicina C_{1a} , norfloxacin PI e clortetraciclina PE. O teste t para os interceptos mostrou que o $t_{cal} < t_{tab}$, exceto para gentamicina C_1 e C_{1a} e norfloxacin PI. Os resultados mostraram que houve efeito multiplicativo na curva para todos os antibióticos, exceto para gentamicina C_{1a} (PE e PI) e norfloxacin (PI). A gentamicina C_1 (PE e PI) também apresentou efeito aditivo, portanto há efeito multiplicativo e aditivo. A padronização externa para a clortetraciclina não apresentou efeito matriz. No Apêndice C (Tabelas 1 a 3) e nas Figuras 10 e 11 estão apresentados à avaliação estatística dos parâmetros analisados e os gráficos dos efeitos obtidos, respectivamente. Logo podemos inferir que as inclinações são significativamente diferentes exceto para a clortetraciclina na PE, portanto deve-se utilizar a curva em matriz. O efeito multiplicativo é obtido quando, ao comparar as inclinações das curvas em solvente e matriz, o $t_{cal} > t_{tab}$ para as inclinações e o aditivo ao comparar os interceptos.

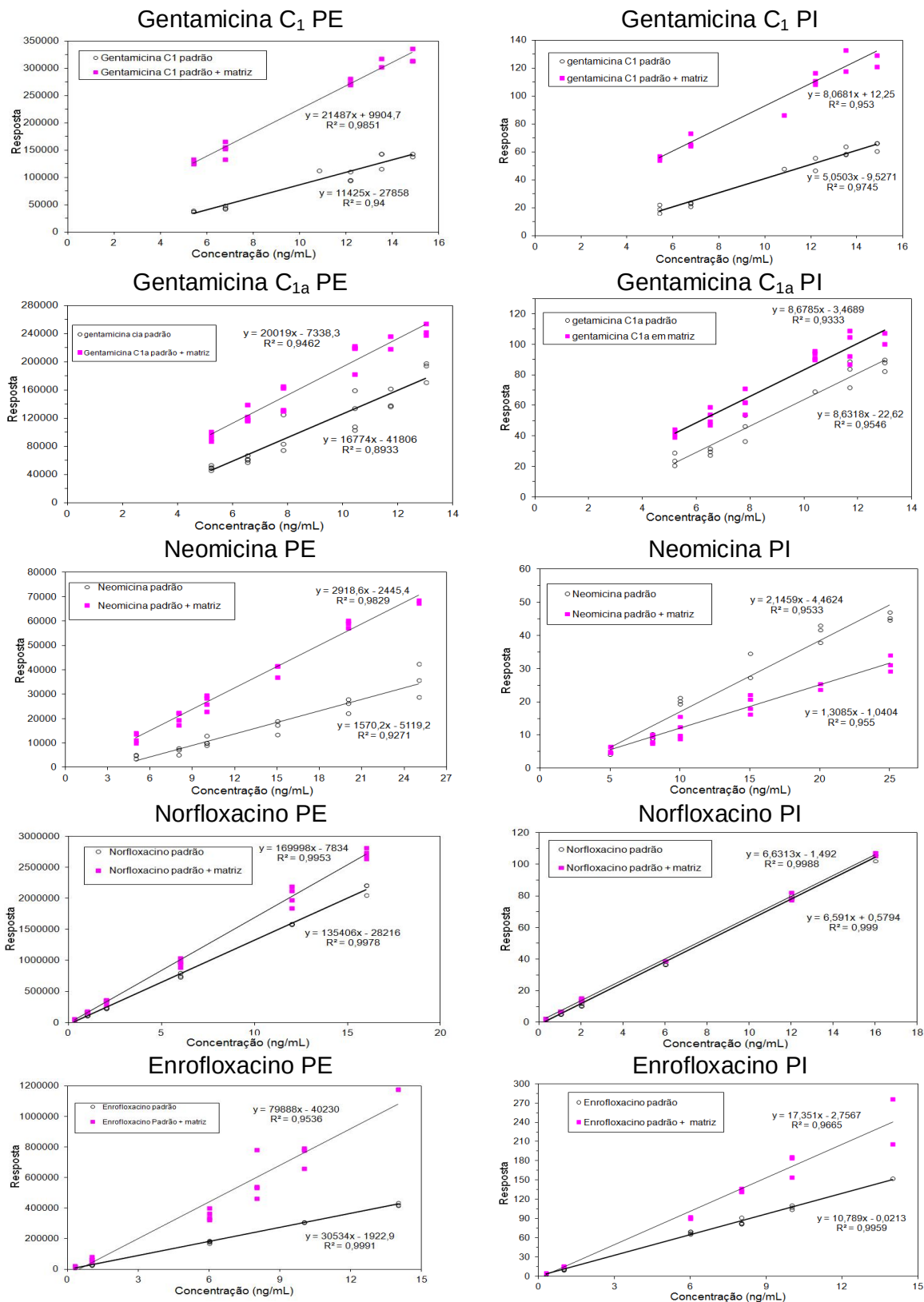


Figura 10 - Linearidade da PE e PI em solvente e matriz da Gentamicina C₁, Gentamicina C_{1a}, Neomicina, Norfloxacin e Enrofloxacin.

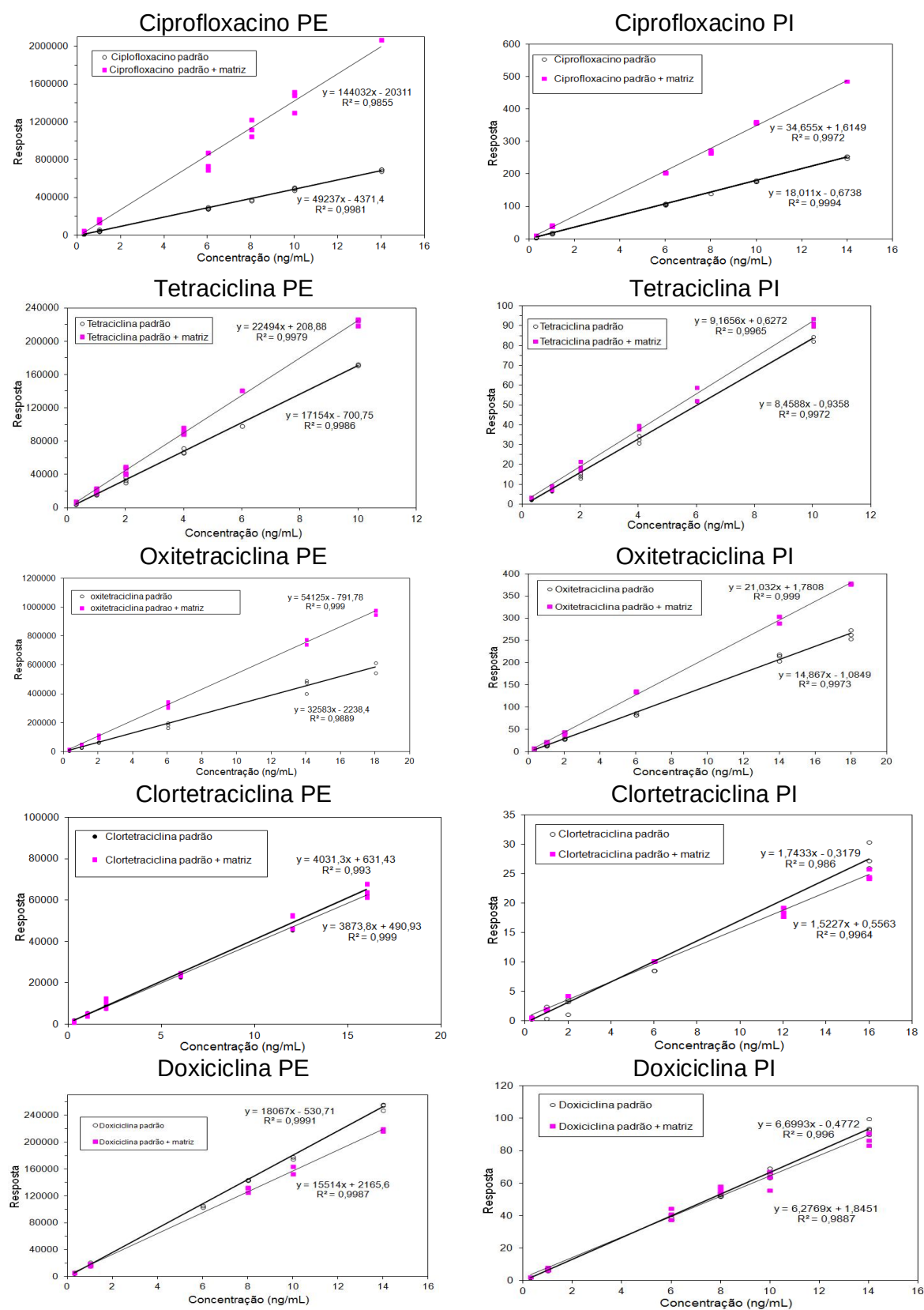


Figura 11 - Linearidade da PE e PI em solvente e matriz do Ciprofloxacino, Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina e Doxiciclina.

3.4. Precisão e exatidão

O estudo da precisão e exatidão do método na matriz leite foi realizado em quadruplicata independentes para a verificação da recuperação dos antibióticos norfloxacino, enrofloxacino, ciprofloxacino, doxiciclina, tetraciclina e clortetraciclina nas concentrações de 2,5 a 40 $\mu\text{g/kg}$; oxitetraciclina de 1,5 a 40 $\mu\text{g/kg}$; gentamicina C_1 de 27,0 a 60,76 $\mu\text{g/kg}$; gentamicina C_1 de 26 a 58,5 $\mu\text{g/kg}$; e neomicina de 25 a 125 $\mu\text{g/kg}$. Os percentuais de recuperação dos antibióticos em função da concentração na PE variaram de 71,9 a 119,0% e na recuperação média de 92,4 a 100,9%, na PI de 76,7 a 120,6% e na recuperação média de 93,5 a 101,7%, exceto para a neomicina que foi de 41,3 a 57,3% e de 49,8 a 60,6%, respectivamente. Entretanto na PI também não foi considerado o norfloxacino que teve recuperação acima de 133% (Tabela 8). Os coeficientes de variação variaram em média 6,1 a 12,4% na PE e de 7,7 a 12,6% na PI, não considerando neomicina nas duas padronizações e norfloxacino na PI, como pode ser observado na Tabela 8. A recuperação obtida para a maioria dos antibióticos encontrava-se dentro da faixa de aceitabilidade recomendada pelo Codex Alimentarius, que é de 70 a 120% (EC, 2002), evidenciando a exatidão do método. Entretanto, os percentuais de recuperação obtidos para o norfloxacino foram adequados apenas quando a padronização externa foi utilizada, visto que na padronização interna, percentuais de recuperação maiores que 133% foram obtidos. Para a neomicina, tanto a padronização externa quanto a interna forneceram percentuais de recuperação inferiores a 70%. Para ter uma melhor recuperação dentro da faixa recomendada há necessidade de estudar outros métodos de clean-up da amostra, pois apenas a precipitação da proteína não foi eficiente.

A repetibilidade intermediária do equipamento foi avaliada estatisticamente pelo teste de Grubs, que apresentou valores inferiores ao valor crítico de Grubs. Considerando a massa relativa do analito e a complexidade da matriz, os valores dos coeficientes de variação evidenciaram a precisão do método, visto encontrar-se dentro da faixa recomendada de 0,81 a 29,13% considerando a concentração em cada faixa (Tabela 8), ou seja, menor ou igual a 30% em relação ao critério de aceitabilidade (HORWITZ, 1995; EC, 2002).

Tabela 8 - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos antibióticos em amostras adicionadas de diferentes concentrações de padrão utilizando padrão externo e interno

Antibiótico / padronização		% Recuperação (Coeficiente de variação, %) por concentração de padrão adicionada (µg/kg)					
Gentamicina C1	27,0	33,75	40,5	47,25	54,0	60,75	Média
P Externa	103,8 (7,1)	71,9 (12,3)	99,8 (5,3)	103,2 (11,4)	87,1 (16,5)	88,6 (21,9)	92,4 (12,4)
P Interna	101,2 (12,4)	94,5 (12,5)	99,6 (8,9)	100,0 (8,9)	99,1 (14,0)	88,7 (19,0)	97,2 (12,6)
Gentamicina C1a	26,0	32,5	39,0	45,5	52,0	58,5	Média
P Externa	77,1 (4,3)	94,3 (8,9)	79,8 (13,9)	85,9 (14,1)	73,8 (4,3)	100,3 (19,5)	85,2 (10,8)
P Interna	85,4 (6,7)	91,6 (5,7)	96,7 (13,6)	87,6 (13,7)	108,6 (8,5)	101,5 (18,8)	95,2 (11,2)
Neomicina	25,0	40,0	50,0	75,0	100,0	125,0	Média
P Externa	57,3 (10,9)	52,4 (3,4)	43,0 (8,1)	41,3 (4,7)	49,1 (11,2)	47,7 (12,2)	48,5 (8,4)
P Interna	58,5 (9,3)	58,7 (11,2)	51,2 (9,9)	49,8 (11,6)	60,6 (16,1)	61,3 (21,6)	56,7 (13,3)
Norfloxacin	2,5	10,0	17,5	25,0	32,5	40,0	Média
P Externa	100,5 (10,6)	105,7 (14,5)	92,2 (4,4)	100,2 (16,0)	99,1 (4,6)	94,0 (14,9)	98,6 (10,8)
P Interna	133,3 (3,1)	229,7 (0,2)	228,8 (0,3)	266,4 (22,7)	113,0 (24,7)	139,3 (6,1)	185,1 (9,5)
Enrofloxacin							
P Externa	92,3 (19,9)	103,2 (12,3)	94,8 (6,9)	94,3 (8,3)	104,4 (6,1)	98,8 (6,4)	98,0 (10,0)
P Interna	104,9 (10,1)	105,2 (11,4)	97,0 (17,9)	93,6 (10,3)	103,2 (5,9)	100,6 (6,6)	100,8 (10,4)
Ciprofloxacina							
P Externa	83,3 (1,2)	110,3 (8,8)	90,3 (10,9)	97,0 (6,8)	109,1 (10,4)	98,9 (7,5)	98,1 (7,6)
P Interna	93,1 (12,7)	109,0 (8,3)	91,3 (3,5)	96,0 (9,6)	107,3 (9,5)	100,4 (8,5)	99,5 (8,7)
Doxiciclina							
P Externa	89,5 (10,5)	107,7 (9,5)	92,9 (6,0)	102,3 (11,2)	103,2 (6,4)	97,0 (2,4)	98,7 (7,7)
P Interna	94,8 (21,4)	101,7 (7,0)	93,3 (11,6)	99,7 (13,9)	105,0 (11,5)	96,9 (4,2)	98,6 (11,6)
Tetraciclina							
P Externa	93,2 (14,0)	102,2 (11,4)	87,9 (3,2)	103,8 (4,1)	105,5 (10,0)	98,8 (7,8)	98,6 (8,4)
P Interna	108,0 (6,2)	103,4 (9,2)	89,8 (14,1)	102,6 (5,9)	104,1 (10,6)	100,4 (10,1)	101,4 (9,4)
Clortetraciclina							
P Externa	119,0 (10,6)	97,4 (12,7)	91,9 (7,6)	100,3 (6,4)	102,1 (3,9)	94,5 (7,6)	100,9 (8,1)
P Interna	120,6 (0,8)	93,0 (8,4)	94,4 (15,7)	100,9 (7,9)	103,0 (5,3)	98,4 (8,4)	101,7 (7,7)
Oxitetraciclina	1,5	10,0	17,5	25,0	32,5	40,0	Média
P Externa	88,1 (6,7)	104,9 (11,1)	87,7 (2,6)	99,4 (6,6)	108,2 (4,8)	99,8 (5,0)	98,0 (6,1)
P Interna	76,7 (6,5)	99,5 (10,9)	86,1 (8,2)	95,7 (9,4)	104,0 (4,1)	99,0 (7,2)	93,5 (7,7)

Inicialmente foi considerado tanto para linearidade, efeito matriz; precisão e exatidão os seguintes valores: 25, 50, 75, 100, 125; 150; 175 e 200% do LMR dos antibióticos; entretanto, o que foi observado é que os antibióticos que tinham maior ionização suprimiam totalmente ou quase totalmente os que ionizavam menos. Para a neomicina observou que, além de ionizar muito pouco, mesmo aumentando a concentração, a mesma tendia a permanecer constante. Por este motivo houve necessidade de mudar a faixa de trabalho na avaliação do método utilizando a descrita acima.

3.5. Limites de detecção e quantificação do equipamento e do método

Os limites de detecção e de quantificação do equipamento e do método (LDE, LQE, LDM e LQM, respectivamente) para os antibióticos estão relacionados na Tabela 9. Os níveis de quantificação devem ser iguais ou inferiores aos LMRs estabelecidos para as substâncias, e, para aquelas cujo nível de tolerância é zero, considera-se o limite de detecção do método, desde que apresente uma resposta inequívoca de acordo com o discriminado na Tabela 1 (EC, 2002; PASCHOL et al., 2008). A doxiciclina e a norfloxacinina não tem LMR definido para o leite, portanto, o LDM para estas substâncias são 1,5 e 0,46 µg/L, respectivamente.

Tabela 9 - Limites de detecção e quantificação do equipamento (LDE e LQE) e do método (LQE e LQM), e limites de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) do método

Substância	LDE (ng)	LQE (ng)	LDM (µg/L)	LQM (µg/L)	CC α (µg/L)	CC β (µg/L)
Gentamicina C1	0,081	0,27	8,18	27,0	235,64	290,69
Gentamicina C1a	0,085	0,28	7,88	26,0	229,63	271,32
Neomicina	0,25	0,83	8,30	12,5	550,28	612,53
Norfloxacino	0,05	0,17	0,46	1,5	7,27	12,66
Enrofloxacino	0,032	0,11	1,50	2,5	111,98	128,24
Ciprofloxacino	0,05	0,17	0,46	1,5	113,99	133,99
Doxiciclina	0,01	0,033	1,50	2,5	4,42	8,50
Tetraciclina	0,01	0,033	0,46	1,5	107,09	115,23
Clortetraciclina	0,015	0,05	0,46	1,5	106,04	112,93
Oxitetraciclina	0,013	0,042	0,46	1,5	107,52	116,60

3.6. Limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método

Os limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) para os antibióticos foram estimados pelos dados obtidos nos ensaios de recuperação e precisão sob condições de repetitividade (EC, 2002; PASCHOL et al., 2008). Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para os antibióticos estão descritos na Tabela 9. $CC\alpha$ e $CC\beta$ são utilizados para decidir se uma amostra atende ou não a legislação vigente, pois levam em consideração recuperação e precisão do método validado. No caso da doxiciclina e norfloxacino que não possuem LMR consideramos os valores de $CC\beta$ (8,50 µg/L e 12,66 µg/L respectivamente) em vez do LDM (1,50 µg/L e 0,46 µg/L respectivamente) para decidir que a amostra não atende a legislação vigente. As substâncias que apresentam LMR utilizam os valores $CC\alpha$ em vez do LMR para se decidir se a amostra é conforme ou não conforme.

4. OCORRÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ANTIBIÓTICOS NAS AMOSTRAS DE LEITE

As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram calculados considerando a padronização externa e utilizando a curva analítica na matriz. Todos os tipos de antimicrobianos pesquisados foram detectados nas amostras. Com relação à ocorrência dos antimicrobianos nas amostras, observa-se na Tabela 10 que 91,8% (236) das amostras de leite em pó coletadas apresentou resíduo de antibiótico exceto para gentamicina. Apesar de em menor proporção os outros tipos de leite, 48,9% (91) para leite pasteurizado e 36,1% (161) para o leite UHT, apresentaram de resíduo de antibiótico. De modo geral, a maioria das amostras coletadas (54,8%), apresentou algum tipo de resíduo de antibiótico sendo que algumas apresentaram mais de um tipo de resíduo.

Dentre todas as amostras de leite analisadas em relação ao somatório de tetraciclina (clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina), nenhum resultado foi superior ao LMR (BRASIL, 2012). As amostras que apresentaram resíduos de tetraciclina variaram desde o limite de detecção do método a 34,73 µg/mL, que é inferior ao LMR permitido. Em relação à quantidade de amostras coletadas por região e tipo de leite, a região Norte para o leite em pó, seguida das regiões Centro Oeste, Sul e Nordeste, foram as que apresentaram o maior percentual do somatório de resíduo de tetraciclina

acima do LDM, 58 amostras (98%), 27 (93%), 16 (89%) e 83 (81%), respectivamente (Figura 12). Destas amostras observa-se que a oxitetraciclina foi o antibiótico que mais foi detectado nas amostras de leite em pó seguido do leite pasteurizado e UHT, sendo 194 amostras (75,5%), 58 (31,2%) e 68 (15,2%), respectivamente (Tabela 11). Sendo que as regiões centro oeste e norte foram as que tiveram a maior proporção do resíduo de oxitetraciclina em relação à quantidade de leite coletada (Tabela 11).

Tabela 10 - Ocorrência e teores de antibióticos em amostras positivas de leite em pó, leite UHT e leite pasteurizado

Antibiótico	Leite em pó		Leite UHT		Leite pasteurizado	
	Ocorrência Nº (%)	Teor (µg/L)	Ocorrência Nº (%)	Teor (µg/L)	Ocorrência Nº (%)	Teor (µg/L)
Oxitetraciclina	194 (75,5)	>LDM – 9,87	68 (15,2)	>LDM – 4,65	58 (31,2)	>LDM – 3,94
Clortetraciclina	85 (33,0)	1,62 – 27,7	52 (11,6)	>LDM – 17,3	3 (1,6)	1,81 – 5,02
Tetraciclina	78 (30,4)	>LDM – 9,96	27 (6,1)	>LDM – 4,84	13 (7,0)	>LDM – 6,67
Doxiciclina	68 (26,4)	>LDM – 42,7	41 (9,2)	>LDM – 27,0	1 (0,5)	>LDM <LQM
Norfloxacino	92 (35,8)	>LDM – 44,8	42 (9,4)	>LDM – 36,4	4 (2,1)	>LDM - 3,06
Enrofloxacin	96 (37,4)	>LDM – 20,4	63 (14,1)	>LDM – 14,6	15 (8,0)	>LDM - 5,0
Ciprofloxacino	123 (47,9)	>LDM – 12,6	78 (17,5)	>LDM – 6,81	34 (18,3)	>LDM – 2,03
Gentamicina	0 (0)	Nd*	4 (0,9)	≥LDM <LQM	1 (0,5)	≥LDM <LQM
Neomicina	46 (17,9)	>LDM - 25	17 (3,8)	≥LDM <LQM	19 (10,2)	≥LDM <LQM
Total	236 (91,8)		161 (36,1)		91 (48,9)	

* nd: não detectado

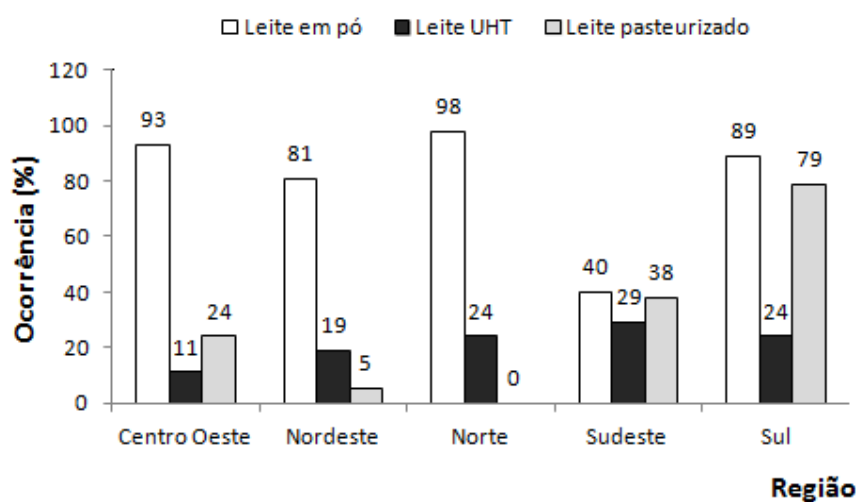


Figura 12 - Distribuição percentual das amostras positivas para o somatório de tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina e tetraciclina) por tipo de leite e região.

Tabela 11 - Quantidade e percentual de resíduos de tetraciclinas encontrado nas amostras de leite por regiões brasileiras e tipo de leite

CLORTETRACICLINA																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	8	27,6	0	0	21	72,4	3	5,5	0	0,0	52	94,5	1	2,7	0	0	36	97,3
Nordeste	38	36,9	0	0	65	63,1	21	14,9	1	0,7	119	84,4	1	4,8	0	0	20	95,2
Norte	18	30,5	0	0	41	69,5	14	14,0	0	0,0	86	86,0	0	0,0	0	0	0	0,0
Sudeste	17	35,4	0	0	31	64,6	10	12,0	0	0,0	73	88,0	0	0,0	0	0	104	100
Sul	4	22,2	0	0	14	77,8	3	4,4	0	0,0	65	95,6	1	4,2	0	0	23	95,8
Total	85	33,1	0	0	172	66,9	51	11,4	1	0,2	395	88,4	3	1,6	0	0	183	98,4
Varição +	1,62 a 27,74 µg/L (85 – 33,1 %)						>LDM a 17,31 µg/L (52 – 11,6 %)						>LDM a 5,02 µg/L (3 – 1,6 %)					
OXITETRACICLINA																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	21	72,4	6	20,7	2	6,9	1	1,8	1	1,8	53	96,4	1	2,7	6	16,2	37	81,1
Nordeste	52	50,5	26	25,2	25	24,3	2	1,4	12	8,5	127	90,1	0	0,0	1	4,8	20	95,2
Norte	36	61,0	19	32,2	4	6,8	6	6,0	12	12,0	82	82,0	0	0	0	0	0	0
Sudeste	11	22,9	7	14,6	30	62,5	3	3,6	16	19,3	64	77,1	4	3,8	27	26,0	104	70,2
Sul	7	38,9	9	50,0	2	11,1	1	1,5	14	20,6	53	77,9	5	20,8	14	58,3	24	20,8
Total	127	49,4	67	26,1	63	24,5	13	2,9	55	12,3	379	84,8	10	5,4	48	25,8	185	68,8
Varição +	>LDM a 9,87 µg/L (194 – 75,5 %)						>LDM a 4,65 µg/L (68 – 15,2 %)						>LDM a 3,94 µg/L (58 - 31,2 %)					
TETRACICLINA																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	8	27,6	0	0,0	21	72,4	2	3,6	2	3,6	51	92,7	0	0	1	2,7	36	97,3
Nordeste	30	29,1	7	6,8	66	64,1	6	4,3	4	2,8	131	92,9	0	0	0	0	21	100
Norte	10	16,9	5	8,5	44	74,6	7	7,0	0	0,0	93	93,0	0	0	0	0	0	0
Sudeste	9	18,8	5	10,4	34	70,8	0	0,0	3	3,6	80	96,4	5	4,8	6	5,8	93	89,4
Sul	2	11,1	2	11,1	14	77,8	1	1,5	2	2,9	65	95,6	1	4,2	0	0,0	23	95,8
Total	59	23,0	19	7,4	179	69,6	16	3,6	11	2,5	420	94,0	6	3,2	7	3,8	173	93,0
Varição +	>LDM a 9,96 µg/L (78 – 30,4 %)						>LDM a 4,84 µg/L (27 – 6,1 %)						>LDM a 6,67 µg/L (13 – 7,0 %)					

Como observado anteriormente, as 120 amostras de leite de Minas Gerais analisadas pelo método de triagem - Kit Snap, apresentaram resultados abaixo do limite de detecção do kit (30 µg/L), ou seja, abaixo do LMR. Este resultado foi confirmado pela análise das amostras no CLAE EM/EM, sendo que o somatório de tetraciclina nas amostras foi menor que o LDM (0,46 µg/L) e apenas 26 amostras (21,7%) apresentaram um somatório de resíduos de tetraciclinas na faixa de $\geq$ LDM a 8,01 µg/L, que também foi menor que o limite de detecção do kit.

Os princípios ativos enrofloxacino mais ciprofloxacino nas amostras de leite em pó foram encontrados em maior quantidade na região Centro Oeste (20; 68,9%), seguida pela região Nordeste (64; 62,2%) e Sul (11; 61,1%). Nas amostras de leite UHT e pasteurizado foi encontrado, em maior proporção em relação ao somatório na região Sul, 26 (38,3%) e 12 (50,0%), respectivamente. A ciprofloxacina foi o resíduo encontrado em maior proporção nas amostras de leite, 123 (47,9%) para leite em pó, 78 (17,5%) para UHT e 34 (18,3%) para pasteurizado, sendo que, na região Nordeste, o leite em pó foi o que mais contribuiu (58; 56,3%). Porém nenhuma amostra apresentou resultado superior ao LMR (UE, 2010) sendo a variação de $\geq$ LDM a 30,05 µg/mL (Figura 13 e Tabela 12).

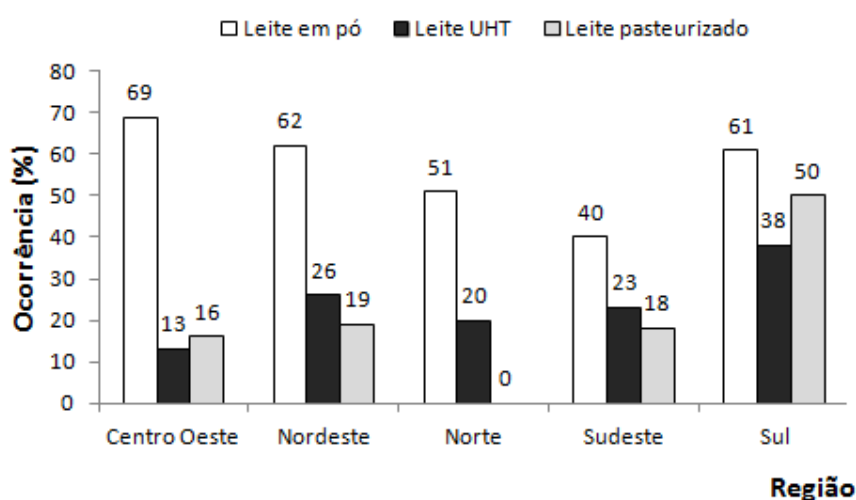


Figura 13 - Distribuição percentual das amostras positivas por tipo de leite e região para somatório de Enrofloxacino e Ciprofloxacino.

Tabela 12 - Quantidade e percentual de resíduos de enrofloxacino, ciprofloxacino e somatório de gentamicina encontrados nas amostras de leite por regiões brasileiras e tipo de leite

ENROFLOXACINO																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	3	10,3	7	24,1	19	65,5	1	1,8	2	3,6	52	94,5	1	2,7	1	2,7	35	94,6
Nordeste	23	22,3	19	18,4	61	59,2	6	4,3	16	11,3	119	84,4	0	0,0	3	14,3	18	85,7
Norte	2	3,4	21	35,6	36	61,0	1	1,0	14	14,0	85	85,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Sudeste	13	27,1	4	8,3	31	64,6	0	0,0	11	13,3	72	86,7	0	0,0	2	1,9	102	98,1
Sul	0	0,0	4	22,2	14	77,8	3	4,4	9	13,2	56	82,4	0	0,0	8	33,3	16	66,7
Total	41	16,0	55	21,4	161	62,6	11	2,5	52	11,6	384	85,9	1	0,5	14	7,5	171	91,9
Variação +	>LDM - 20,36 µg/L (91 – 37,4 %)						>LDM - 14,6 µg/L (63 – 14,1 %)						>LDM a 5,0 µg/L (15 – 8,0 %)					

CIPROFLOXACINO																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	6	20,7	10	34,5	13	44,8	3	5,5	3	5,5	49	89,1	4	10,8	2	5,4	31	83,8
Nordeste	39	37,9	19	18,4	45	43,7	9	6,4	20	14,2	112	79,4	1	4,8	2	9,5	18	85,7
Norte	6	10,2	15	25,4	38	64,4	7	7,0	7	7,0	86	86,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Sudeste	15	31,3	3	6,3	30	62,5	5	6,0	6	7,2	72	86,7	3	2,9	15	14,4	86	82,7
Sul	2	11,1	8	44,4	8	44,4	5	7,4	13	19,1	50	73,5	0	0,0	7	29,2	17	70,8
Total	68	26,5	55	21,4	134	52,1	29	6,5	49	11,0	369	82,6	8	4,3	26	14,0	152	81,7
Variação +	>LDM - 12,58 µg/L (123 – 47,9 %)						>LDM - 6,81 µg/L (78 – 17,5 %)						>LDM - 2,03 µg/L (34 – 18,3 %)					

SOMATÓRIO DE GENTAMICINA																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	0	0	0	0	29	100	0	0	0	0	55	100	0	0	0	0	37	100
Nordeste	0	0	0	0	103	100	0	0	1	0,7	140	99,3	0	0	0	0	21	100
Norte	0	0	0	0	59	100	0	0	3	3	97	97	0	0	0	0	0	0
Sudeste	0	0	0	0	48	100	0	0	0	0	83	100	0	0	1	1	103	99,0
Sul	0	0	0	0	18	100	0	0	0	0	68	100	0	0	0	0	24	100
Total	0	0	0	0	29	100	0	0	4	0,9	443	99,1	0	0	1	0,5	185	99,5
Variação +	< LDM (0 – 0 %)						≥LDM <LQM (4 – 0,9 %)						≥LDM <LQM (1 – 0,5 %)					

A gentamicina total foi o antibiótico encontrado em menor proporção nas amostras de leite, sendo que apenas cinco (5) amostras positivas foram encontradas (4 de leite UHT e 1 pasteurizado) e ficaram entre o LDM e o de LQM, correspondendo a 2,6% do total de amostras coletadas. Dentre as amostras positivas, a região Norte apresentou três amostras e a nordeste e sudeste uma, cada (Tabela 12). Nenhum dos resíduos ultrapassou o LMR conforme determinado pelo Codex Alimentarius (2015).

O total de amostras positivas com resíduo de neomicina foi 82 correspondendo a 9,1% das amostras coletadas. Todas ficaram na faixa entre o LDM e LQM, exceto uma amostra de leite em pó da região Nordeste com teor de 25 µg/mL (Tabela 13). A maior proporção de amostras positivas foi as de leite em pó, correspondendo a 17,9% (46) das amostras coletadas (Tabela 13). Nenhum dos resíduos ultrapassou o LMR permitido na legislação (BRASIL, 2012).

De acordo com a União Europeia (UE, 2010) não se deve utilizar doxiciclina em animais produtores de leite, entretanto, nas amostras de leite em pó, UHT e pasteurizado foram encontradas 26,4% (68), 9,2% (41), 0,5% (1) de amostras positivas, respectivamente, coletadas por tipo de leite (Tabela 13). O total de amostras não conformes para doxiciclina foi 12,4% (110 amostras), com resultados variando na faixa de maior que o LDM a 42,74 µg/L, sendo as regiões Nordeste e Norte as que apresentaram o maior percentual de resultados não conformes (Tabela 13). Para o norfloxacino não existe limite especificado nas legislações Brasileiras, Codex Alimentarius ou Regulamentos da União Européia, portanto, foi considerado o LMR para este princípio ativo como valor do LDM (0,46 µg/L). O percentual de amostras não conformes por tipo de leite foi de 35,8% (92) para o leite em pó, 9,4% (42) para UHT e 2,1% (4) para leite pasteurizado, perfazendo um total de 15,5% (138) de amostras não conformes, com resultado variando de maior que LDM a 44,77 µg/L (Tabela 13).

O percentual total de amostras não conformes para doxiciclina e norfloxacino foi de 18,4 %, o que corresponde a 164 amostras de leite coletadas, sendo que, 84 (9,4%) destas amostras foram condenadas pelos dois princípios ativos. A região Norte (27 %) e Nordeste (25 %) tiveram os maiores percentuais de condenação em relação à quantidade coletada por região (Figura 14).

Tabela 13 - Quantidade e percentual de resíduos de neomicina, doxiciclina e norfloxacino encontrados nas amostras de leite por regiões brasileiras e tipo de leite

NEOMICINA																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	0	0	10	34,5	19	65,5	0	0	1	1,8	54	98,2	0	0	3	8,1	34	91,9
Nordeste	1	1,0	25	24,3	77	74,8	0	0	4	2,8	137	97,2	0	0	0	0,0	21	100
Norte	0	0	8	13,6	51	86,4	0	0	4	4,0	96	96,0	0	0	0	0	0	0
Sudeste	0	0	2	4,2	46	95,8	0	0	7	8,4	76	91,6	0	0	13	12,5	91	87,5
Sul	0	0	0	0,0	18	100,0	0	0	1	1,5	67	98,5	0	0	3	12,5	21	87,5
Total	1	0,4	45	17,5	211	82,1	0	0	17	3,8	430	96,2	0	0	19	10,2	167	89,8
Variação +	>LDM a 25 µg/L (46 – 17,9 %)						≥LDM <LQM (17 – 3,8 %)						≥LDM <LQM (19 – 10,2 %)					

DOXICICLINA																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	2	6,9	7	24,1	20	69,0	0	0	2	3,6	53	96,4	0	0	0	0	37	100
Nordeste	18	17,5	14	13,6	71	68,9	1	0,7	13	9,2	127	90,1	0	0	1	4,8	20	95,2
Norte	1	1,7	16	27,1	42	71,2	1	1	13	13,0	86	86,0	0	0	0	0	0	0
Sudeste	4	8,3	3	6,3	41	85,4	0	0	10	12,0	73	88,0	0	0	0	0	104	100
Sul	0	0,0	3	16,7	15	83,3	1	1,5	0	0,0	67	98,5	0	0	0	0	24	100
Total	25	9,7	43	16,7	189	73,5	3	0,7	38	8,5	406	90,8	0	0	1	0,5	185	99,5
Variação +	>LDM - 42,74 µg/L (68 – 26,4 %)						>LDM a 26,99 µg/L (41 – 9,2 %)						≥LDM <LQM (1 – 0,5%)					

NORFLOXACINO																		
Região	Amostras leite em pó						Amostras leite UHT						Amostras leite pasteurizado					
	>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM		>LQM		≥LDM <LQM		< LDM	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Centro oeste	3	10,3	5	17,2	21	72,4	1	1,8	1	1,8	53	96,4	1	2,7	0	0	36	97,3
Nordeste	29	28,2	15	14,6	59	57,3	6	4,3	7	5,0	128	90,8	0	0	1	4,8	20	95,2
Norte	4	6,8	19	32,2	36	61,0	3	3,0	12	12,0	85	85,0	0	0	0	0	0	0
Sudeste	12	25,0	1	2,1	35	72,9	0	0,0	6	7,2	77	92,8	0	0	0	0	104	100
Sul	0	0,0	4	22,2	14	77,8	2	2,9	4	5,9	62	91,2	0	0	2	8,3	22	91,7
Total	48	18,7	44	17,1	165	64,2	12	2,7	30	6,7	405	90,6	1	0,5	3	1,6	182	97,8
Variação +	>LDM a 44,77 µg/L (92 – 35,8 %)						>LDM a 36,40 µg/L (42 – 9,4 %)						>LDM a 3,06 µg/L (4 – 2,1 %)					

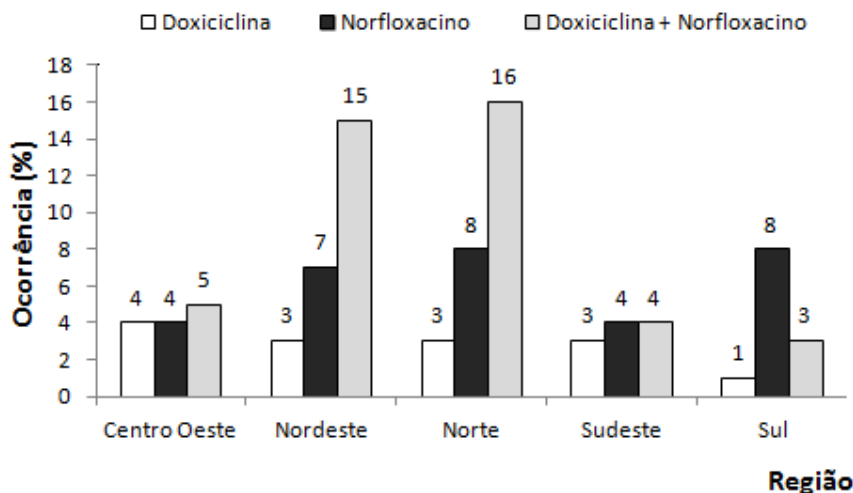


Figura 14 - Distribuição percentual das amostras positivas por tipo de leite e região para Doxiciclina e Norfloxacino.

Em termos de utilização de algum tipo de resíduo de antibiótico, no geral, a região Sul (66,4%) foi aquela que mais apresentou resultados positivos para antibióticos em relação à proporção coletada. De modo geral, mais da metade (54,8%) das amostras apresentaram algum tipo de antibiótico, sendo 18,4% proibidos para uso em animais produtores (Figura 15).

No Apêndice D (Figuras 1 a 7) foram apresentados os cromatogramas com os fragmentos de quantificação e identificação e o espectro de massas de uma amostra de leite em pó integral com resíduo de tetraciclina (2,2 µg/L), clortetraciclina (27,29 µg/L), oxitetraciclina (3,93 µg/L), doxiciclina (42,74 µg/L), enrofloxacino (20,36 µg/L), ciprofloxacino (9,70 µg/L), e norfloxacino (45,36 µg/L).

De acordo com o MAPA (BRASIL, 2012a; 2012b; 2013; 2014; 2015) em monitoramento do PNRC/Animal, de 2011 a 2014 foram analisados 683 amostras de leite quanto a resíduos de antimicrobianos (beta-lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina e fluoroquinolonas). Destas amostras analisadas apenas três (3) estavam acima do LMR, sendo uma para resíduo de oxitetraciclina em 2012 e duas (2) para cloxacilina (beta-lactâmicos) em 2013 e 2014. Entretanto o resíduo de norfloxacino não foi monitorado pelo MAPA neste período. Baseado nos resultados obtidos neste estudo seria necessário o monitoramento da doxiciclina e norfloxacino, antibióticos não permitidos pelas legislações vigentes (UE, 2010; BRASIL, 2012; CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

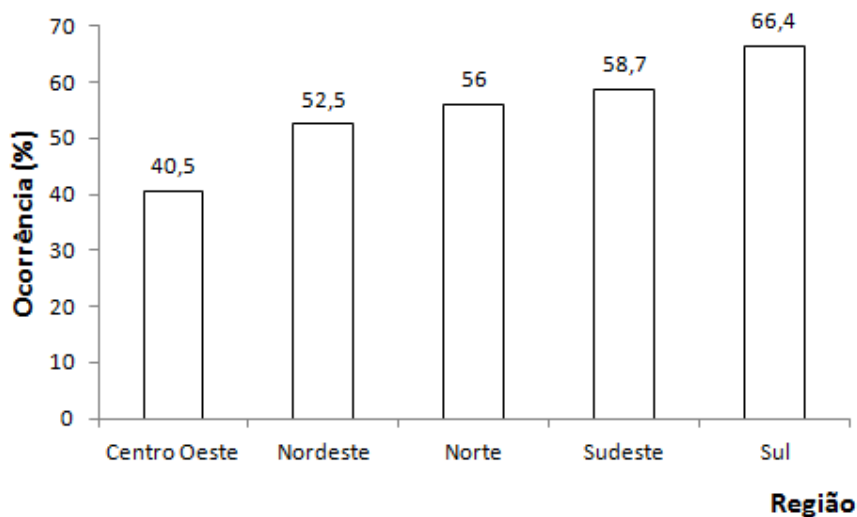


Figura 15 - Distribuição % das amostras positivas por região para resíduos de antibióticos nas amostras em geral.

Visando a segurança alimentar e evitar que tenhamos problemas relacionados à seleção de bactérias resistentes, é necessário que os produtores sejam orientados quanto ao uso indiscriminado de resíduos de antibióticos, principalmente aqueles proibidos e o tempo de carência de cada princípio ativo. Precisa-se de uma participação mais ativa do Brasil na venda de medicamentos veterinários, principalmente antimicrobianos, e impor um controle mais rigoroso das barreiras comerciais e das fronteiras. Somente com a participação de todos podemos conseguir alimentos seguros e de boa qualidade, pois estes são fundamentais para uma melhor saúde da população.

CONCLUSÃO

A metodologia analítica por CLAE-EM/EM desenvolvida e validada mostrou ser adequada ao uso pretendido, ou seja, análise de antibióticos das classes tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em leite.

O kit snap tetraciclina demonstrou ser um método de triagem adequado para análise de resíduos de tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina) em amostras de leites em pó, UHT e pasteurizado. Demonstrou ser rápido e de menor custo em relação ao método confirmatório, podendo ser usado como um screening.

O método CLAE-EM/EM desenvolvido e validado permitiu avaliar a presença e quantificar os antibióticos tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, gentamicina, ciprofloxacino, enrofloxacino e norfloxacino em amostras de leite. Este atendeu aos requisitos de validação. Entretanto para a neomicina, há necessidade de outros tratamentos de clean-up para atendimento dos requisitos de exatidão.

Dentre as 980 amostras de leite analisadas, 54,8% (488) apresentaram algum tipo dos antibióticos estudados. Em 18,4% (164) das amostras, os antimicrobianos encontrados eram de uso proibido (doxiciclina e norfloxacino) e os outros antibióticos estavam abaixo dos limites permitidos pelas legislações vigentes.

Em relação à quantidade de amostras coletadas por regiões brasileiras. As regiões Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro oeste tiveram 66,4%, 58,7%, 56,0%, 52,5% e 40,5%, respectivamente de algum tipo de resíduo de antibiótico. As regiões Norte (27%) e Nordeste (25%) foram as que apresentaram o maior percentual de condenação em relação às drogas de uso proibido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14029. Validação de Métodos Analíticos**. N° ABNT NBR 14029:2005. 2ª ed. 2005. Disponível em: <<http://dc371.4shared.com/doc/jPfm19Xv/preview.html>>. Acessado em 15 jul. 2012.
- AFSSA. Agence Française de Sécurité Sanitaire - Des Aliments. Laboratoire D'études et de Recherches Sur Les Médicaments Vétérinaires et Les Désinfectants. **Method for the screening of antibiotic residues in muscle milk by LC/MS-MS**. Fougères, France. 2010. rev. 03. LMV/RMV/SM/PTC/04. AN.
- ALMEIDA, L. P.; VIEIRA, R. L.; ROSSI, D. A.; CARNEIRO, A. L.; ROCHA, M. L. Resíduos de antibióticos em leite de propriedades rurais da região de Uberlândia, MG. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 3, p. 83-87, 2003.
- ANTIGNAC, J. P.; BIZEC, B. L.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, p. 325-334, 2003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo - PAMVet. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2015.
- ARAUJO, G. B.; SANTOS, H. A.; FARIAS, C. E.; VIANA, D. A. F.; VIEIRA, E. S.; JUNIOR, A. M. F. Detecção de resíduo de antibiótico em leite *in natura* em laticínio sob inspeção federal. **Scientia Plena**, n. 4, v. II, p. 1-6, 2015.
- BANDEIRA, M. G. L.; SANTOS, A. S.; ABRANTES, M. R.; REBOUÇAS, G. G.; SILVA, M. E. T.; PAIVA, W. S.; MAIA, M. O.; LIMA, L. S. C.; SILVA, J. B. A.; DAMACENO, M. N. Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos a antibióticos de uso farmacêutico. In: Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 23-24, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/pdf/foodscienceproceedings/microal/278.pdf>>. Acessado em: 11 jan. 2015.
- BANDO, E.; OLIVEIRA, R. C.; FERREIRA, G. M.; MACHINSKI, M. Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Parana, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 911-914, 2009.
- BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity**. New York: Wiley, 292 p, 1980.
- BERENDSEN, B.; STOLKER, L.; DE JONG, J.; NIELEN, M.; TSERENDORJ, E.; SODNOMDARJAA, R.; CANNAVAN, A.; ELLIOTT, C. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1955-1963, 2010.
- BLASCO, C.; TORRES, C. M.; PICO, Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 895-913, 2007.

- BLASCO, C.; CORCIA, A.; PICÓ, Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 116, p. 1005-1012, 2009.
- BOGIALLI, S.; CIAMPANELLA, C.; CURINI, R.; CORCIA, A.; LAGANÀ, A. Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6810-6815, 2009.
- BOHM, D. A.; STACHEL, C. S.; GOWIK, P. Validated determination of eight antibiotic substance groups in cattle and pig muscle by HPLC/MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 2, p. 407-419, 2011.
- BOHM, D. A.; STACHEL, C. S.; GOWIK, P. Validation of a multi-residue method for the determination of several antibiotic groups in honey by LC-MS/MS. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 2943-2953, 2012.
- BRABANDER, H. F.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, V. J.; WILLE, K.; OKERMAN, L.; VANHAECKE, L.; REYBROECK, W.; OOGHE, S.; CORUBELS, S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p. 7964-7076, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, 18 de setembro de 2002, Revoga Portaria n.146, de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 26 out. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Instrução Normativa n. 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**, Brasília, 22 dez. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Análise de resíduos e contaminantes em alimentos. 2011. 32p. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acessado em: 26 de junho 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 07, 04 de abril de 2012, Promove a publicação dos resultados do PNCR/Animal referentes ao exercício do ano de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 abr. 2012a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCR/animal e os programas de 2012 PCNCR/Carne; PNCR/Mel; PNCR/Leite; PNCR/Ovos e PNCR/Pescado – Instrução Normativa SDC n. 07. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 dez. 2012b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 07, 27 de março de 2013, Promove a publicação dos resultados do PNCR/Animal referentes ao exercício do ano de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 mar.

2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 60, 07 de maio de 2014, Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 mai. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 22, 07 de abril de 2015, Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Animal referentes ao exercício do ano de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMvet. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável. Brasília, especial ed., 236p, 2005. Disponível em: <http://www.sonutricao.com.br/downloads/Guia_Alimentar_Populacao_Brasileira.pdf>. Acessado em 28 jun. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 53, de 02 de outubro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL. Metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Brasil, 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0053_02_10_2012.html>. Acessado em: 11 fev. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. Brasília, 158p, 2ª ed. 2014. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira.pdf>. Acessado em 15 jul. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar: Saiba como ter uma alimentação saudável. Brasília, 9p, [2015]. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira.pdf>. Acessado em 15 jul. 2015.
- BRITO, N. M; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.
- BRITO, N. M; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

- BRONDI, S. H. G.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; CAMARGO, L. A.; MAJARON, R. F. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. **Química Nova**, v. 36, p. 153-158, 2013.
- BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974.
- BUKET, E.; ONURDAG, F. K.; BURAK, D.; OZGACAR, S. O.; OKTEM, A. B.; ABBASOGLU, U. Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2212-2215, 2013.
- BUZALSKI, T. H.; REYBROECK, W. Antimicrobials. In: **International Dairy Federation standard (IDF/FIL)**. Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. Brussels: IDF, 1997. Special Issue, p. 26-34.
- CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Dispersive solid phase extraction in the determination of residues and contaminants in food. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 4, p. 227-240, 2012.
- CHÁFER-PERICÁS, C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 1038-1049, 2010.
- CODEX ALIMENTARIUS. Compendio de métodos de análises identificados como idôneos para respaldar os LMR do Codex elaborado pelo comitê do Codex sobre resíduos de medicamentos veterinários dos alimentos. Atualizado na 38ª reunião da comissão do Codex Alimentarius rev. July 2015. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/standards/vetdrugs/en/>>. Acesso em: 17 jul. 2015.
- COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 15-17, 1996.
- CUNHA, M. R. R. **Análise de multirresíduos de antibióticos anfenícois e beta-lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas**, 2009. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- CUNHA FILHO, L. F. C.; GARCIA, A. L.; SCHAFRANSHI, E. B.; PEDRO, J. R.; SILVA, L. C.; STURION, D. J. Incidência de mastite subclínica no início do período de transição em vacas leiteiras da fazenda experimental da UNOPAR, no município de Tamarana, Paraná. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde**, n. 8, v. 1, p. 25-30, 2006.
- DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 209-218, 2004.
- DIETRICH, J. M. Controle de resíduos de antibióticos no leite. **Leite e Derivados**, n. 106, p. 156-162, 2008.
- DISERENS, J. -M.; HENZELIN, A. B.; LE BRETON, M. -H.; PERROUD, M. -C. S. **Antibiotics in milk: Actual situation and compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk**. Nestlé Research Center - Quality & Safety Department, Switzerland. 2009. Disponível em:

- <http://www.irandairy.ir/uploads/Antibiotic%202009_1797.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2012.
- DONKOR, E. S.; NEWMAN, M. J.; TAY, S. C. K.; DAYIE, N. T. K. D.; BANNERMAN, E.; OLU-TAIWO, M. Investigation into the risk of exposure to antibiotic residues contaminating meat and egg in Ghana, **Food Control**, v. 22, p. 869-873, 2011.
- EC (European Commission). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 2002, L 221/8.
- EMA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit – **Committee for Veterinary Medicinal Products Doxycycline** – EMA/MRL/270/97- FINAL october 1997. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500013941.pdf>. acesso em: 20 set. 2012.
- FAGUNDES, C. M.; MOLIN, I. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Informe Agropecuário**, v. 13, n. 155, p. 24-30, 1998.
- FANG, Y.; ZHAI, H.; ZON, Y. Determination of multi-residue tetracyclines and their metabolites in milk by High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. **Agilent Technologies, Inc.**, USA, p.1-14, 2009. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-3816EN.pdf>>. Acessado em: 20 jul. 2012.
- FAO. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. [2012]. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-vetdrugs/details.html?substance=363>>. Acesso em: 20 mai. 2012.
- FAVA, L. W.; PINTO, A. T. Ocorrência de leite ácido e de resíduos de antimicrobianos no leite cru entregue em laticínio na região do Vale do Taquari, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 38, v. 4, p. 419-423, 2010.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
- FONTANA V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da beta-lactamase em *Streptococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, n. 17, v. 4, p. 552-559, 2010.
- FSAI. Food Safety Authority of Ireland. **Rapid test kits for the detection of antibiotics and sulfonamides in milk**. Dublin, Jun., 2002.
- FSCJ - Food Safety Commission of Japan. Risk assessment report norfloxacin (Veterinary Medicinal Products). Na. 2014. Disponível em: <https://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/vetmedicine/norfloxacin_fs60.pdf> acessado em: 28 dez. 2014.
- GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.
- GAUDIN, V.; MARIS, P.; FUSELIER, R.; RIBOUCHON, J. -L.; CADIEU, N.; RAULT, A. Validation of a microbiological method: the star protocol, a five-plate test, for the

- screening of antibiotic residues in milk. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 5, p. 422-433, 2004.
- GOMES, E. R.; DEMOLY, P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, p. 309-316, 2005.
- GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L.; WEYERS, A.; GIACOMELLI, N.; DAVICINO, R.; OVANDO, H.G. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 9, p. 253-256, 1997.
- 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. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HALBERT, L. W.; ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; JOHNSON, G. L. Incidence of false-positive results for assays used to detect antibiotics in milk. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 8, p. 886-888, 1996.
- HARTMANN, W. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: Ocorrência de *Listeria monocytogenes***. 2009.76 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.
- HELLER, D. N.; PEGGINS, J. O.; NOCHETTO, C. B.; SMITH, M. L.; CHIESA, O. A.; MOULTON, K. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. **Journal of Chromatography B**, v. 821, p. 22-30, 2005.
- HOFF, R.; RIBARCKI, F. ZANCANARO, I.; CASTELLANO, L.; SPIER, C.; BARRETO, F.; FONSECA, S.H. Bioactivity-based screening methods for antibiotics residues: a comparative study of commercial and in-house developed kits. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 4, p. 577-586, 2012.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Indicadores IBGE Estatística da Produção Pecuária. Brasil, 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf>. Acessado em 26 de junho de 2015.
- IDEXX LABORATORIES SNAP TETRACYCLINE TEST KIT. **Manual do Kit SNAP**. Westbrook, Maine, USA, 2007.
- INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). NÚCLEO DE DOCUMENTAÇÃO. **Determinação de resíduos de tetraciclina em leite por CLAE com detecção fluorimétrica**. Rio de Janeiro, RJ, [2009]. 11p. Nº 65.3120.083. Rev. 00.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04. Jul. 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf> Acesso em: 04 jan 2015.
- JIMÉNEZ, V.; RUBIESA, A.; CENTRICHB, F.; COMPANYÓA, R.; GUITERASA, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1443-1451, 2011.
- JUNQUEIRA, R. G.; SOUSA, S. V. C.; RUELA, I. C.; LIMA, J. A. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e

- clortetraciclina em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 139-146, 2005.
- KAUFMANN, A.; WIDMER, M. Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem massspectrometry. **Analytica Chimica Acta** v. 79, p. 81-88, 2013.
- LAMB, J. M.; COOK, M. D. Comparative evaluation of the STAR test method with the Difco disc-assay method for detecting inhibitory substance in raw milk. **Food Technology in New Zealand**, v. 17, n. 11, p. 20-21, 1982.
- LAVINSKY, L.; LAVINSKY, J.; LAVINSKY, M.; MACEDO, E. Quimiocirurgia com gentamicina no tratamento da doença de Ménière. **Acta Orl**, p. 10-17, 2005. Disponível em: <<http://www.actaorl.com.br/PDF/23-04-03.pdf>>. Acesso em 23 out. 2012.
- LEE, J. B.; CHUNG, H. H.; CHUNG, Y. H.; LEE, K. G. Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods. **Food Chemistry**, n. 105, v. 4, p. 1726-1731, 2007.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S. G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) Contributions to probability and statistics. **Stanford: Stanford University Press**, p. 278-292, 1960.
- LOPEZ, M. I.; PETTIS, J. S.; SMITH, I. B.; CHU, P. Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1553-1559, 2008.
- LOPES, R. P.; REYES, R. C.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 89, p. 201-208, 2012.
- MAMANI, M. C. V. **Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2007. 208 f. Tese (Doutor em Ciências) - Departamento de Instituto de Química, Unicamp, Campinas - SP, 2007. Disponível em: <<http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtls000416794.pdf>>. Acessado em: 16 jul. 2012.
- MARTIN, J. G. P. Resíduos de Antimicrobianos em Leite – Uma Revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.
- MARTINI, A. L.; WOOD, J. R. Milk intake and the risk of type 2 diabetes mellitus, hypertension and prostate câncer. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 5, p. 688-694, 2009.
- MARTINS-JÚNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 586-592, 2006.
- MARTINS-JÚNIOR, H. A.; KUSSUMI, T. A.; WANGB, A. Y.; LEBRE, D. T. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 397-405, 2007.

- MCGLINCHEY, T. A.; RAFTER, P. A.; REGAN, F.; MCMAHON, G. P. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 1-15, 2008.
- MITCHELL, 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 performance. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 6, p. 742-756, 1998.
- MORAIS, C. M. Q. J.; DURÃES, T. S.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, supl. 1, p. 33-35, 2010.
- MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v. 48, n. 2, p. 118-120, 2004. Simpósio de Atualização em Antibióticos. Disponível em: <<http://www.amrigs.com.br/revista/48-02/s1.pdf>>. Acessado em: 20 jul. 2012.
- MORENO-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. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 921-946, 2009.
- NASCIMENTO, G. G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista Nutrição**, n. 14, v. 2, p. 119-124, 2001.
- NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J.; CEPEDA, A.; GENTE, C. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid Chromatography-tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 78-85, 2012.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.
- NUNES, M. T.; D'ANGELINO, J. L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Higiene Alimentar**, n. 21, v. 149, p. 57-61, 2007.
- OGITA, A.; TAKADA, K.; KAWANA, S. Case report of anaphylaxis due to tetracycline hydrochloride. **Journal of Dermatology**, v. 38, p. 597-599, 2011.
- OLIVEIRA, C. R.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 29, n. 1, p. 59-62, 2007.
- OMS. Organização Mundial da Saúde, Food and Agriculture Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Geneva: WHO 11, 2003.
- ORDÓÑEZ, J. A. (Org.); RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos**. v. 2 Alimentos de origem animal. Trad. MURAD, F. Porto alegre, Artmed; 2005.
- PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, 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. 1190-198, 2008.
- PASSANHA, A.; GARCIA, H. S.; CERVATO-MANCUSO, A. N.; ANDRADE, S. C.; VIEIRA, V. L. Caracterização do consumo de leite em idosos. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v. 21, n. 2, p. 319-326, 2011.
- PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B.; SANTOS, H. F.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.
- PERICÁS, C. C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHARDES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 29, v. 9, p. 1038-1049, 2010.
- PRADO, C. K.; MACHINSKI JUNIOR, M. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 448-456, 2011.
- PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, n. 5, v. 36, p. 697-710, 2013.
- QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS E UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.
- RAISON-PEYRON, N.; MESSAAD, D.; BOUSQUET, J.; DEMOLY, P. Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. **Allergy**, v. 56, n. 8, p. 796-797, 2001.
- REESE, R. E.; BETTS, R. F. **Manual de Antibióticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1995. 633 p.
- RODRIGUES, M. X.; DALL'AGNOLB, L.; BITTENCOURTA, J. V. M. Levantamento da ocorrência de resíduos de antibióticos em leite cru produzido na região dos Campos Gerais, Paraná. **UNOPAR Científica Ciência Biológicas e Saúde**, n. 14, v. 4, p. 237-240, 2012.
- RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G. Otimização e validação de método empregando quechers modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 780-786, 2011.
- RODRÍGUEZ, M. A. R.; GONZÁLEZ-PIÑERA, J. G.; PENIÉ, J. B.; ALONSO, A. L.; AREU, A.; NÚÑEZ, A. P. Tetraciclinas. **Acta Medica**, v. 8, n. 1 p. 75-79, 1998.
- ROSOLEN, M. D.; RAPHAELLI, C. O.; OLIVEIRA, M. Contribuição nutricional de leite e seus derivados na dieta dos brasileiros. Encontro de Pós Graduação da UFPEL, 2013. Disponível em: <http://cti.ufpel.edu.br/cic/arquivos/2013/CA_01189.pdf>. Acessado em 28 jun. 2015
- RÜBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOFF, R. B.; KIST, T. L.; PIZZOLATO, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the

- analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, n. 705, p. 24-29, 2011.
- SAN MARTÍN, B.; CORNEJO, J.; IRAGÜEN, D.; HIDALGO, H.; ANADÓN, A. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1952-1957, 2007.
- SANTOS, P. B.; MESQUITA, H. L.; GUIDINE, A. T.; POVOA, H. C. C.; CORRÊA, J. O. A. Complicações diagnósticas na fibrose cística: métodos de rotina e novas alternativas. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 135-141, 2010.
- SHAO, S.; JIA, X.; ZHANG, J.; MENG, J.; WU, H.; DUAN, H.; TU, X. Multi-residual analysis of 16 beta-agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1115-1121, 2009.
- SIGMA-ALDRICH (Brasil) (Ed.). **Catalago eletrônico**. 2012. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 17 jul. 2012.
- SILVA, C. J.; TEJADA, T. S.; TIMM, C. D. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 4, p. 120-131, 2014.
- SILVA, D. P.; GELLEN, L. F. A.; SILVA, T. S.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Resíduos de antibiótico em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios. **Evidência**, v. 13, n. 2, p. 127-132, 2013.
- SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B.; Fluoroquinolonas X resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 363-369, 2010.
- SILVA, J. R.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Otimização e validação intralaboratorial de método para análise de resíduos de cloranfenicol em leite caprino por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE). **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 90-96, 2010b.
- SILVA, R. G. **Farmacocinética e determinação de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito em tecidos de frangos**. 2004. 75 f. Doutorado (Doutor em Ciências) - Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella spp.* **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.
- SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento**, 2007. 293 p. 2007.293p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SPISSO, B. F.; ARAÚJO-JÚNIOR, M. A. G.; MONTEIRO, M. A.; LIMA, A. M. B.; PEREIRA, M. U.; LUIZ, R. A.; NÓBREGA A. W. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several

- tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 72-84, 2009.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency. **Analyst**, v. 125, p. 535-552, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TROMBETE, F. M.; SANTOS, R. R.; SOUZA, A. L. R. Antibiotic residues in Brazilian milk: a review of studies published in recent years. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 41, n. 2, p. 191-195, 2014.
- UE. Regulamento N. 37/2010 da comissão de 22 dez. 2009 relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. **Jornal Oficial da União Europeia** 20 jan. 2010. Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/legislacao/docs/l_01520100120pt00010072.pdf>. Acessado em: 25 fev. 2010.
- USDA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. **Confirmation of aminoglycosides by HPLC-MS/MS**. Revision 03 Replaces: CLG-AMG1.02 Effective: 06/03/2011. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/PDF/CLG_AMG_1_03.pdf>. Acessado em: 17 jul. 2012.
- VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI - UEM**, v.11, n. 2, p. 26 - 31, 2007.
- ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N.; BROWN-CROWDER, I. Evaluation of screening test for detection of antibiotics residues in goat milk. **Small Ruminant Research** v. 21, p. 155-160, 1996.
- ZHOU, L. J.; YING, G. G.; LIU, S.; ZHAO, J.L.; CHEN, F.; ZHANG, R. Q., PENG, F. Q.; ZHANG, Q. Q. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 123-138, 2012.

APÊNDICE A – Espectro de Massas, Scam dos Produtos Ótimos e Perfil Cromatográfico dos Padrões de Antibióticos

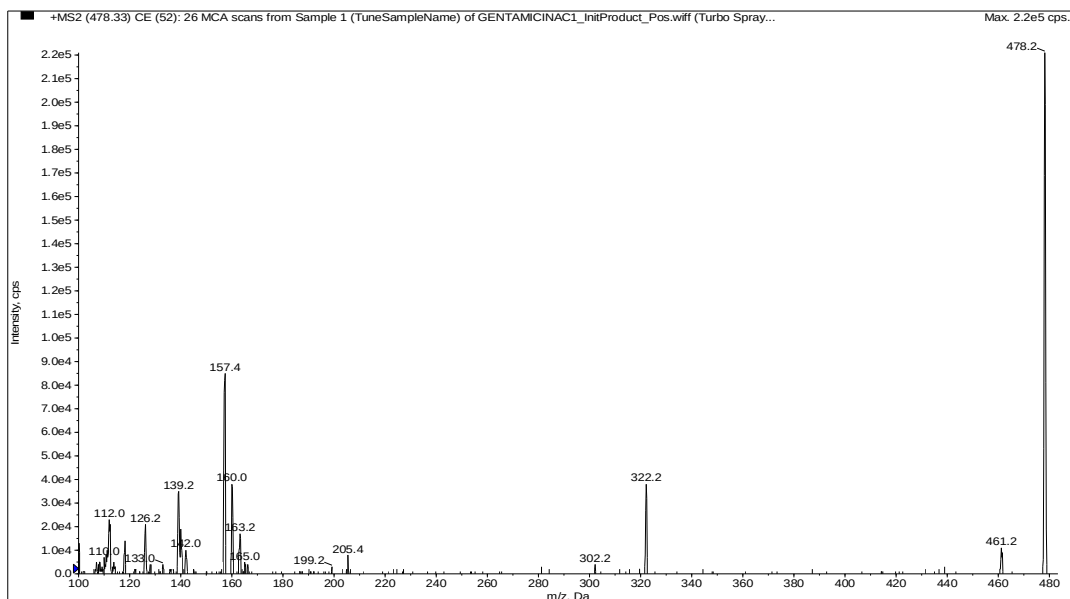


Figura 1a - Espectro de massas da gentamicina C₁ para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

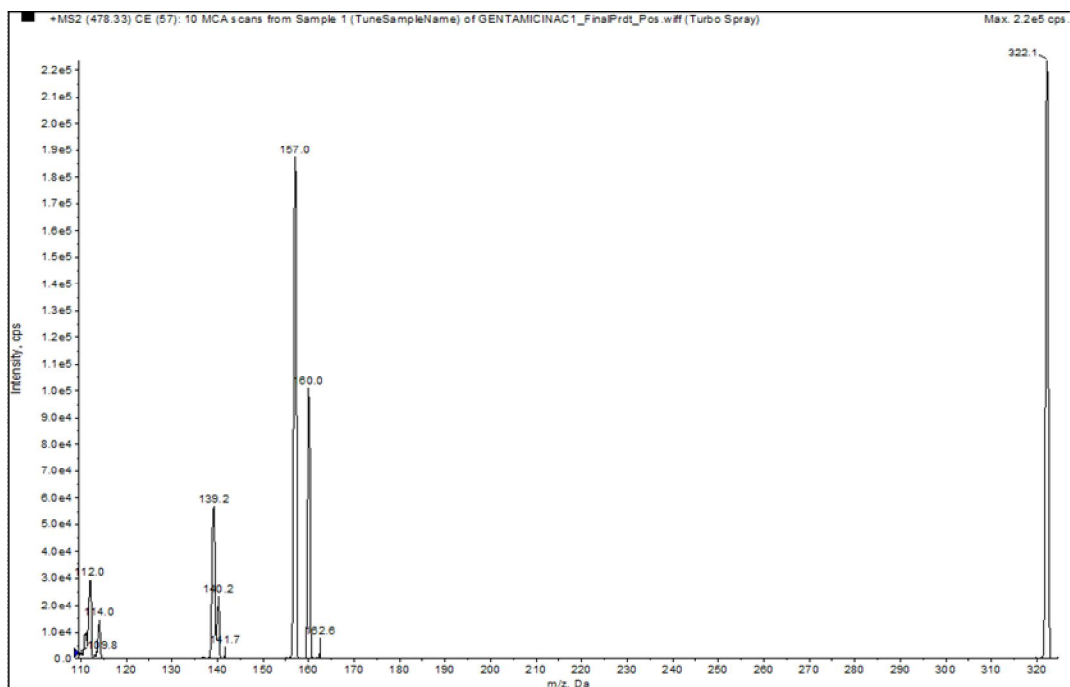


Figura 1b - Scam dos produtos ótimos da gentamicina C₁ em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

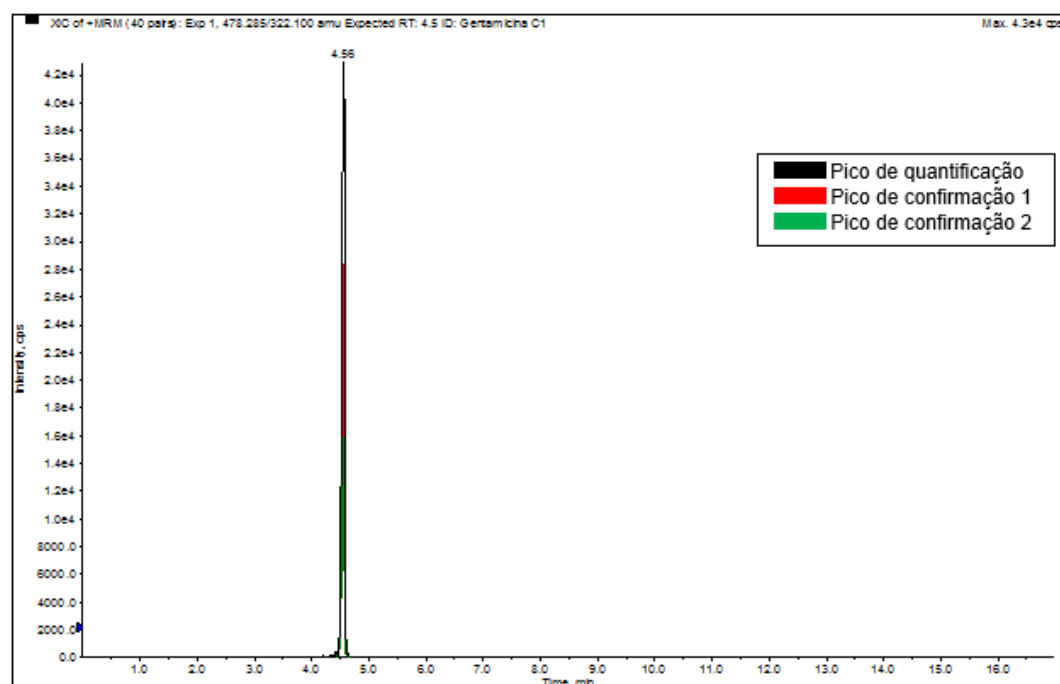


Figura 1c – Cromatograma do padrão de Gentamicina C₁ em solvente - conc. 13,5 ng/mL Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 478,3/322,1$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 478,3/157,0$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 478,3/160,0$) – Condições analíticas: ver item 2.

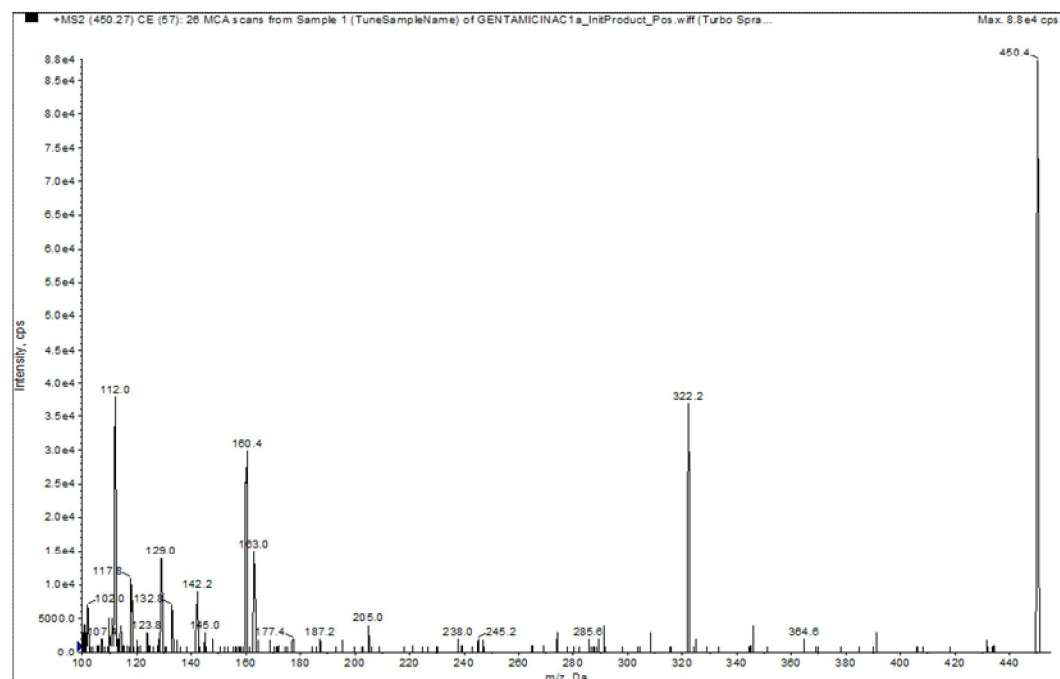


Figura 2a - Scam da gentamicina C_{1a} para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

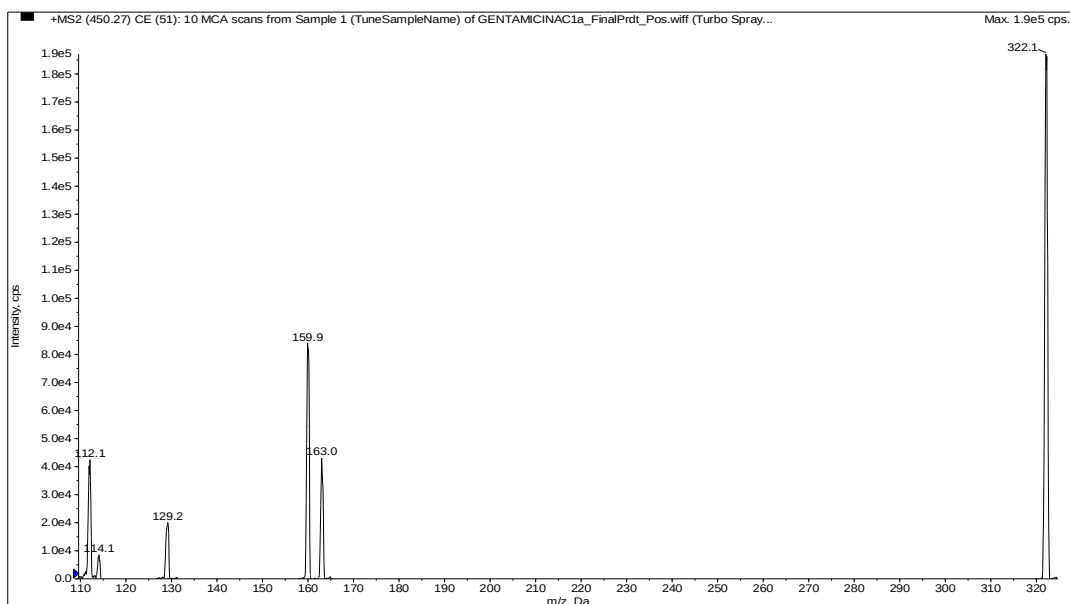


Figura 2b - Scam dos produtos ótimos da gentamicina C_{1a} em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

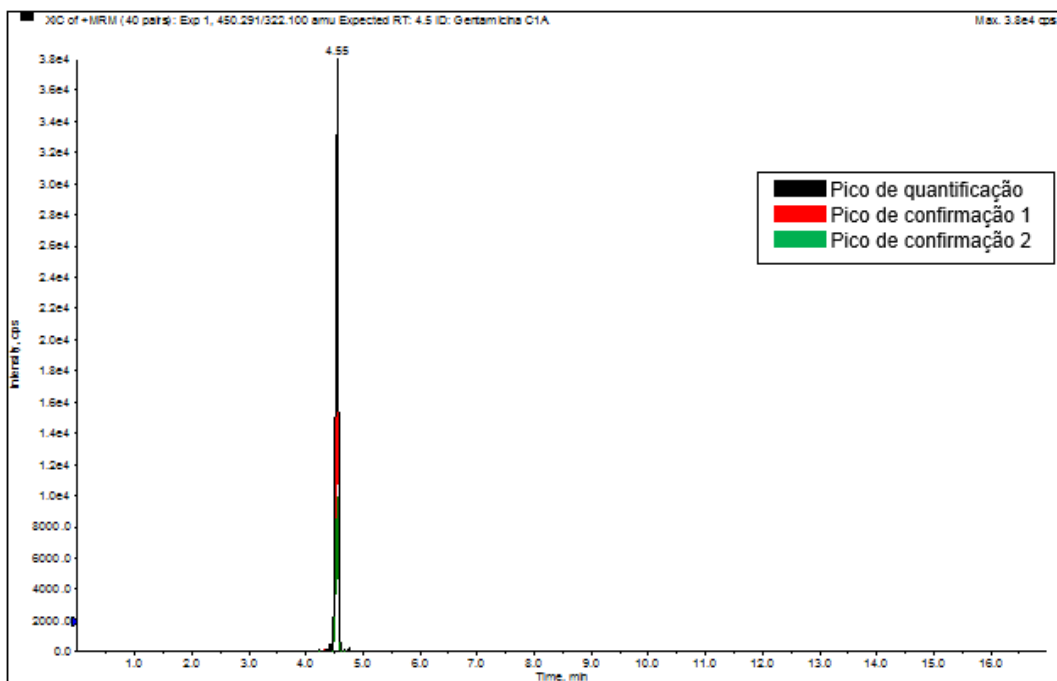


Figura 2c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 450,3/322,1$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 450,3/160,0$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 450,3/163,0$) do padrão de Gentamicina C_{1a} em solvente - conc. 13ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

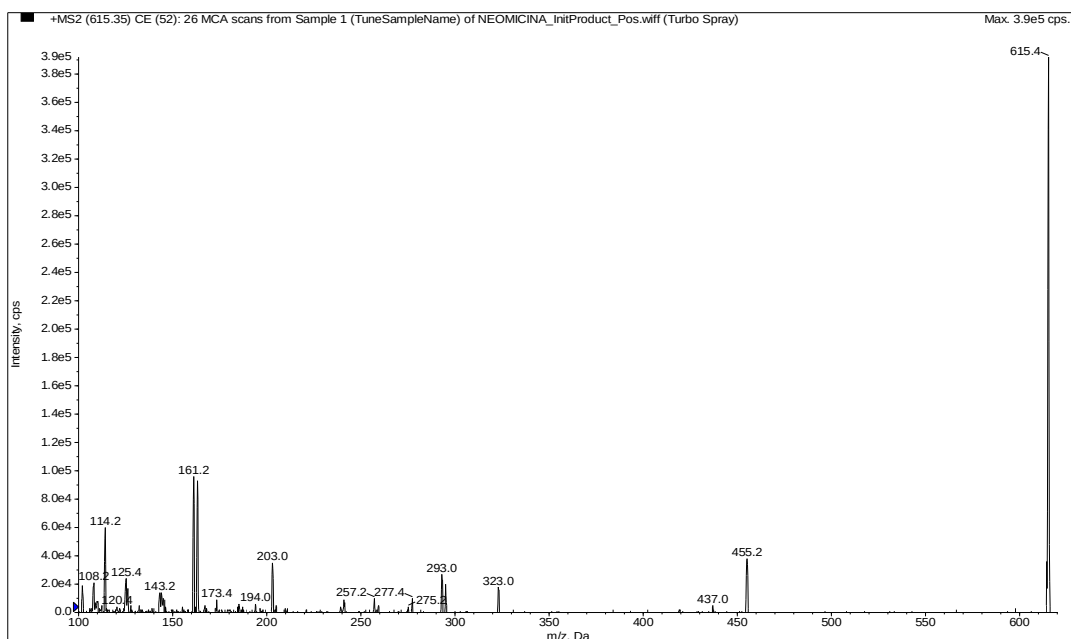


Figura 3a - Scam da neomicina para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

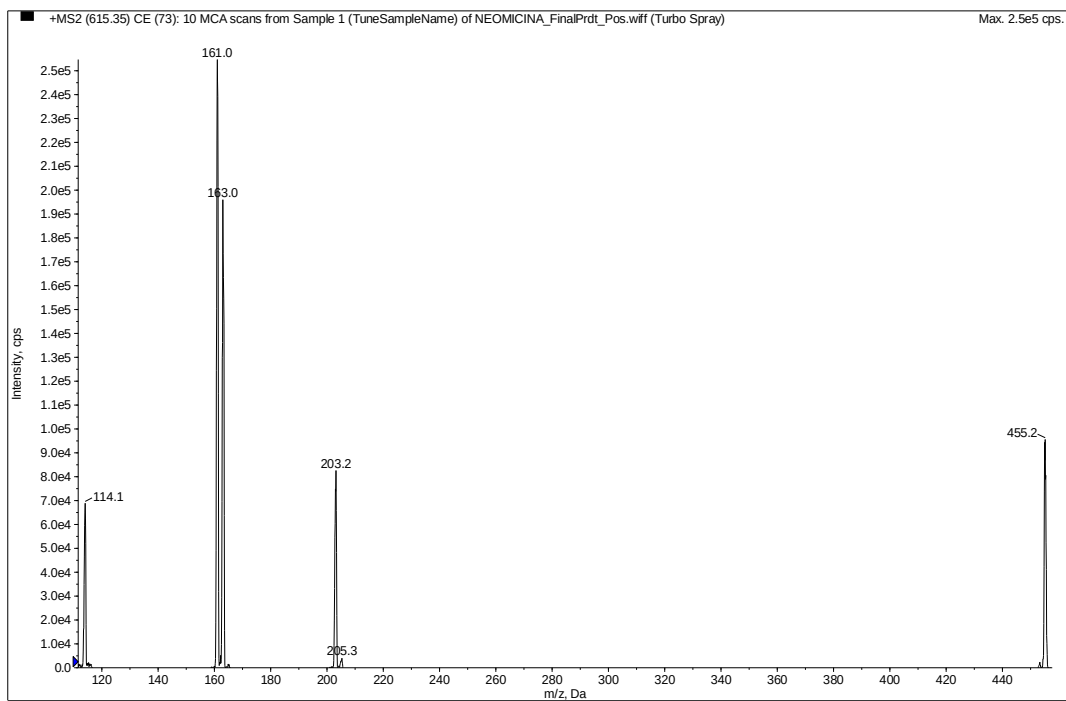


Figura 3b - Scam dos produtos ótimos da neomicina em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

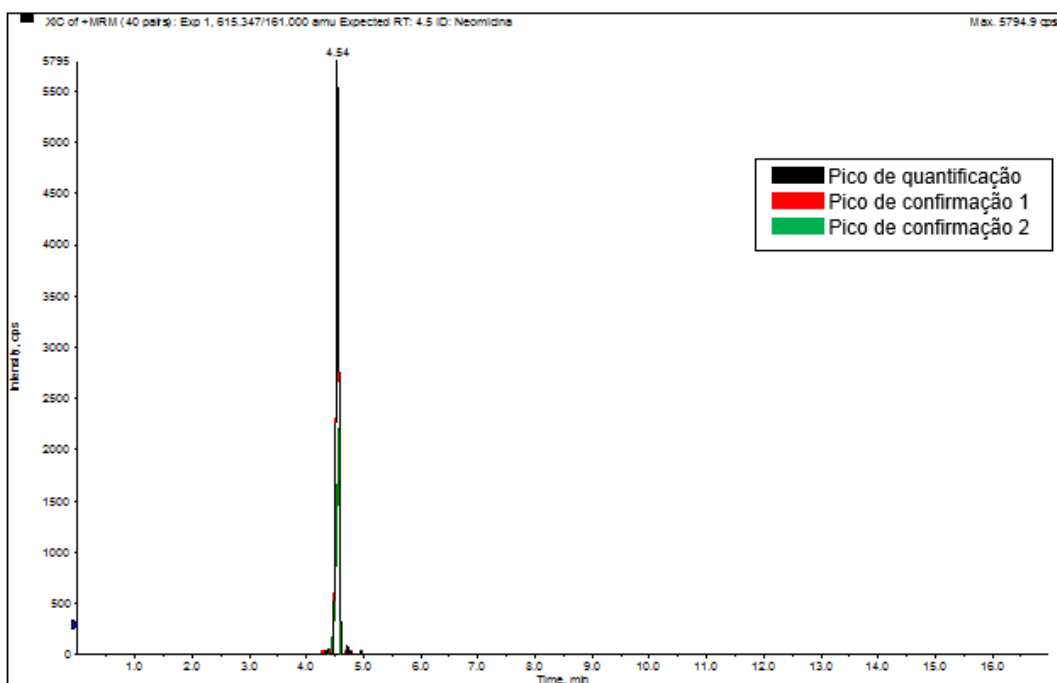


Figura 3c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 615,3/161,0$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 615,3/163,0$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 615,3/455,2$) do padrão de Neomicina em solvente - conc. 14ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

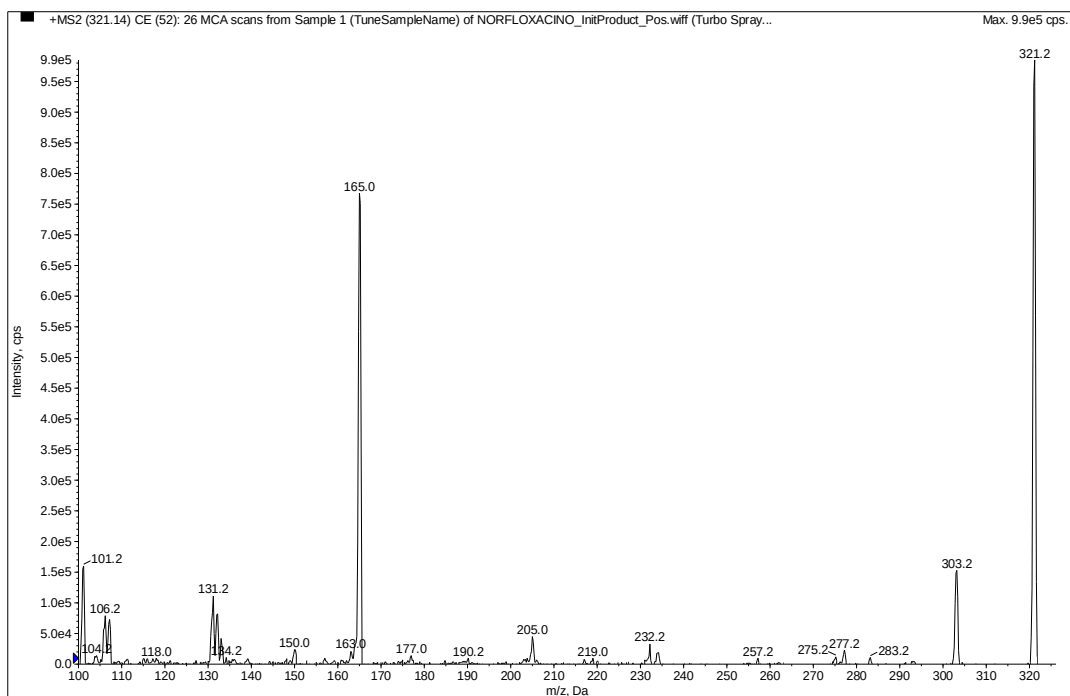


Figura 4a - Scam da norfloxacin para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

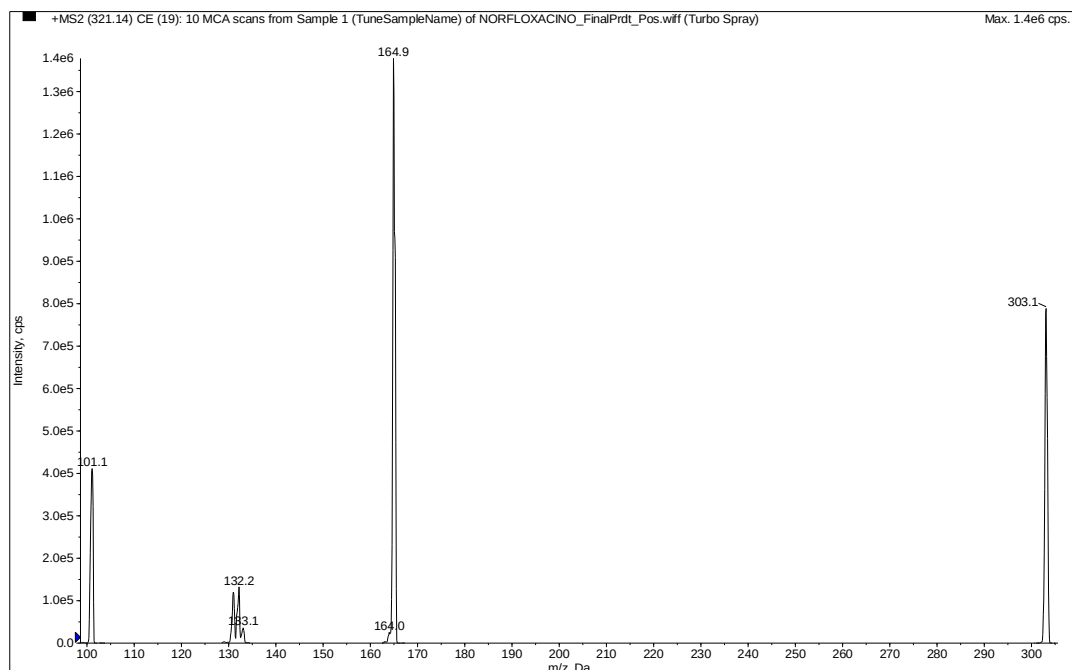


Figura 4b - Scam dos produtos ótimos da norfloxacin em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

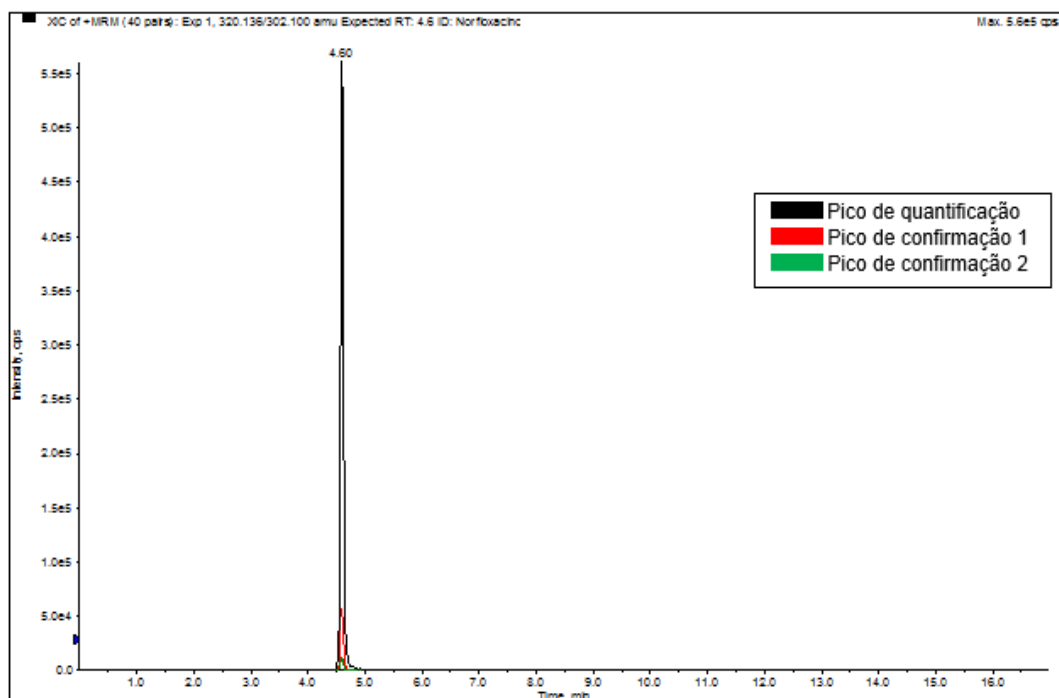


Figura 4c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 320,1/302,1$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 320,1/276,0$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 320,1/231,0$) do padrão de norfloxacin em solvente - conc. 16ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

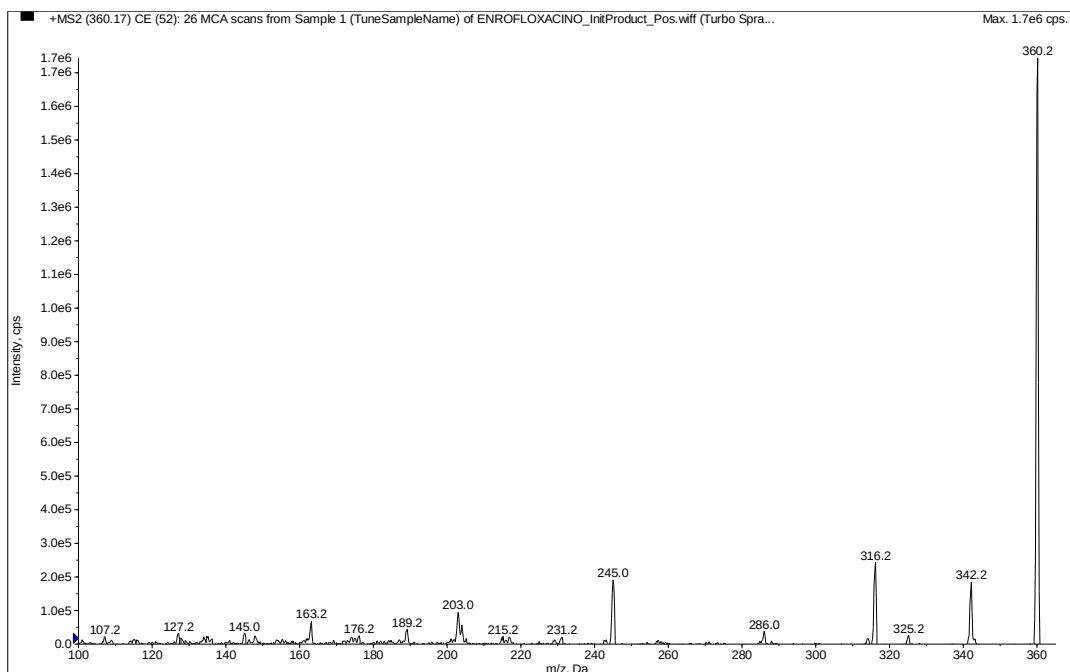


Figura 5a - Scam da enrofloxacino para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

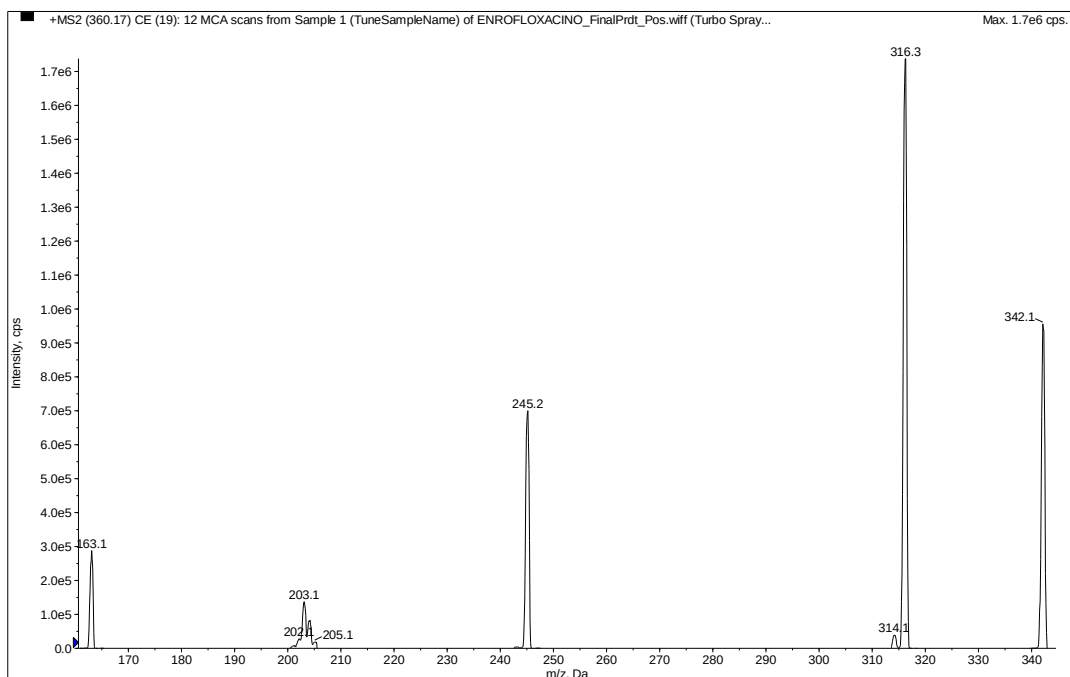


Figura 5b - Scam dos produtos ótimos da enrofloxacino em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

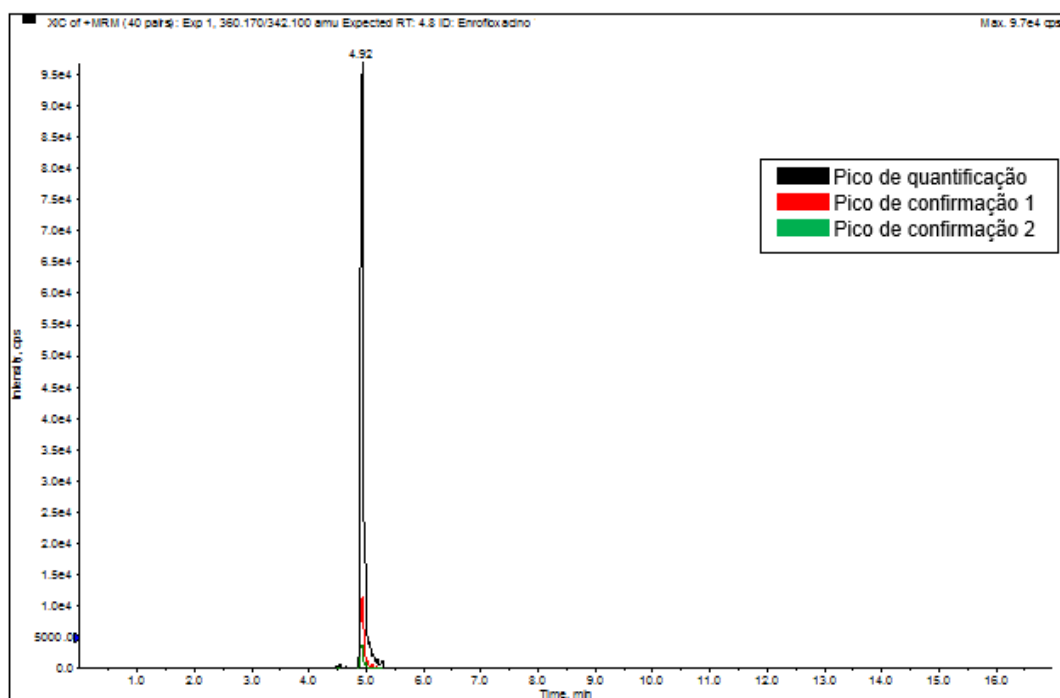


Figura 5c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 360,2/231,0$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 360,2/316,3$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 360,2/245,2$) do padrão de enrofloxacino em solvente - conc. 14ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

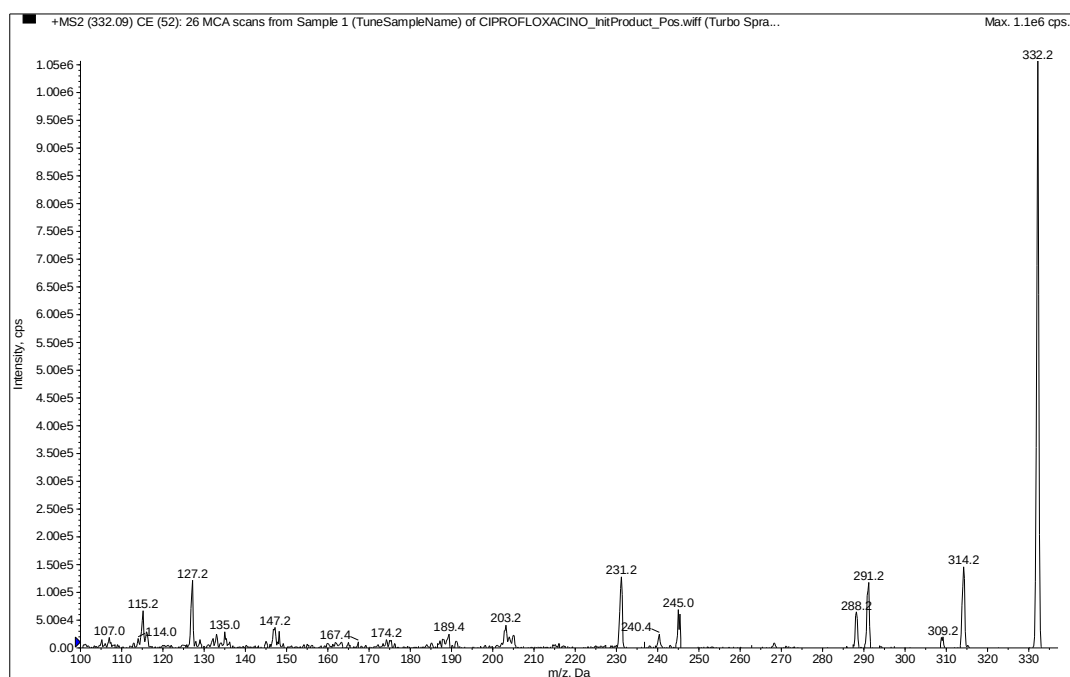


Figura 6a - Scam da ciprofloxacin para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

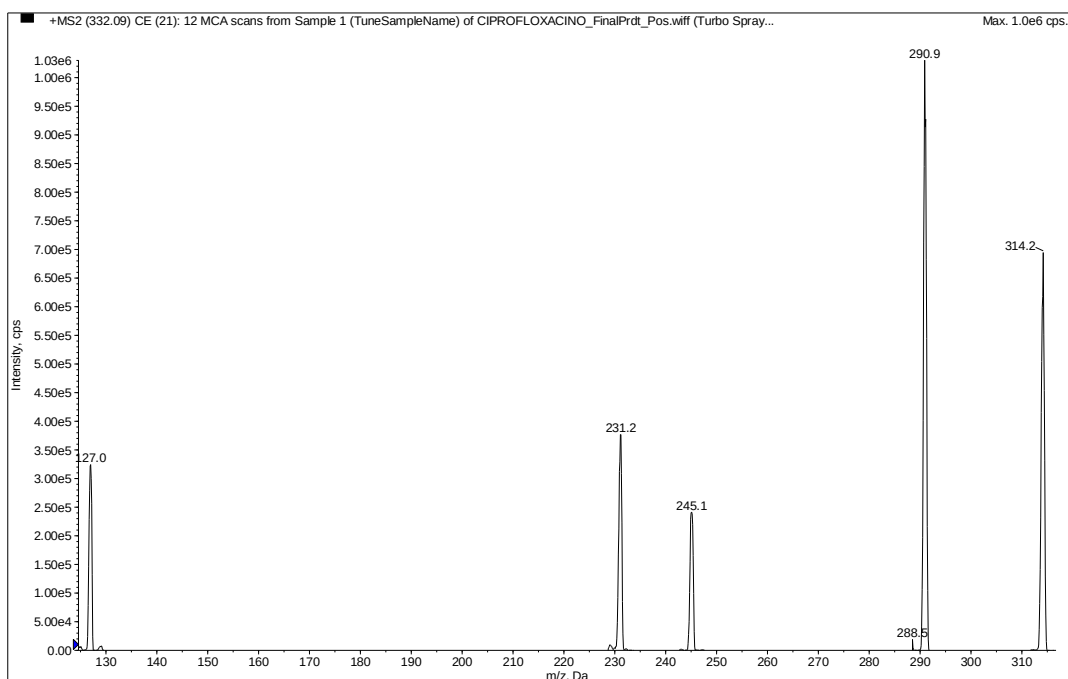


Figura 6b - Scam dos produtos ótimos da ciprofloxacino em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

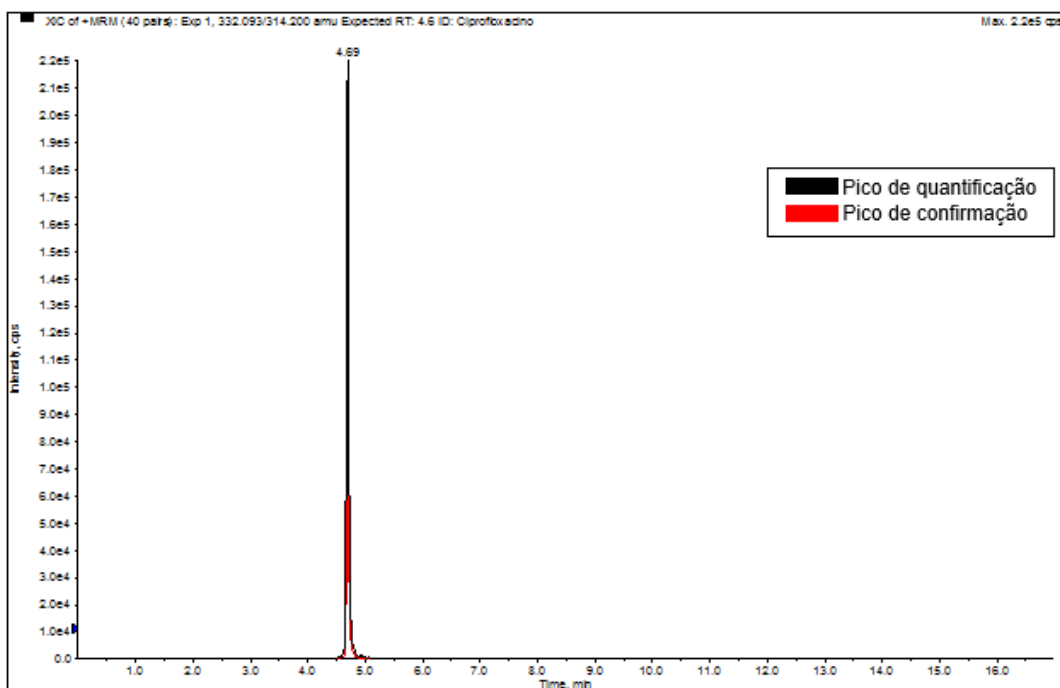


Figura 6c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 332,1/314,2$) e pico de confirmação ($Q_1/Q_3 = 332,1/231,2$) do padrão de Ciprofloxacino em solvente - conc. 14ng/mL – Condições analíticas: ver item 2.

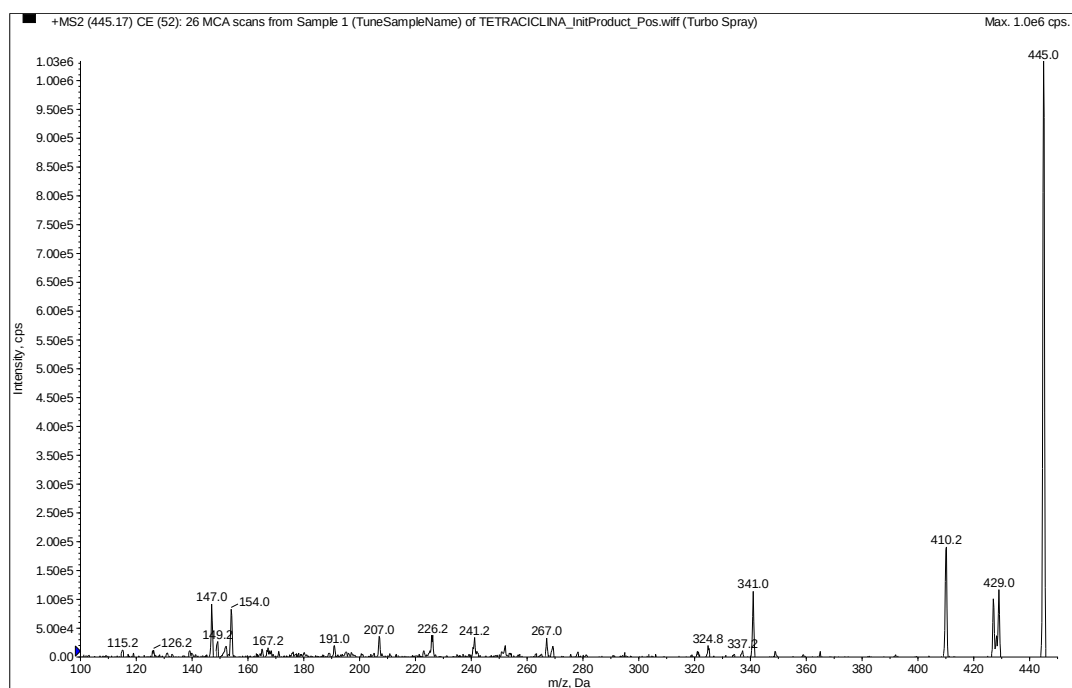


Figura 7a - Scam da tetraciclina para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

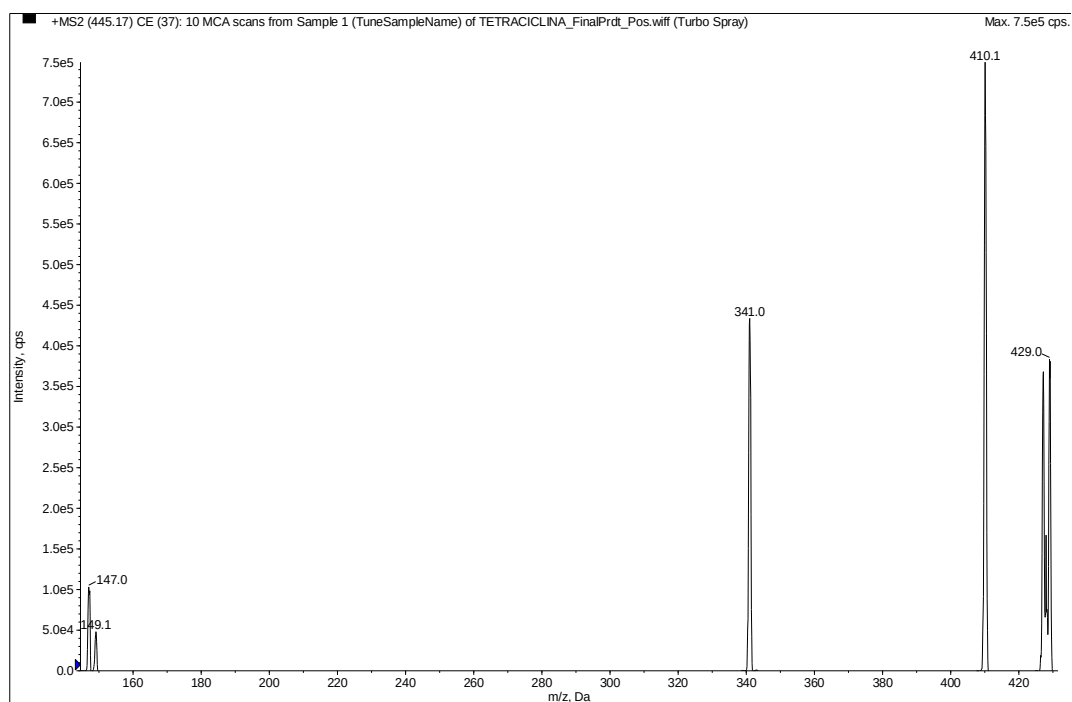


Figura 7b - Scam dos produtos ótimos da tetraciclina em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

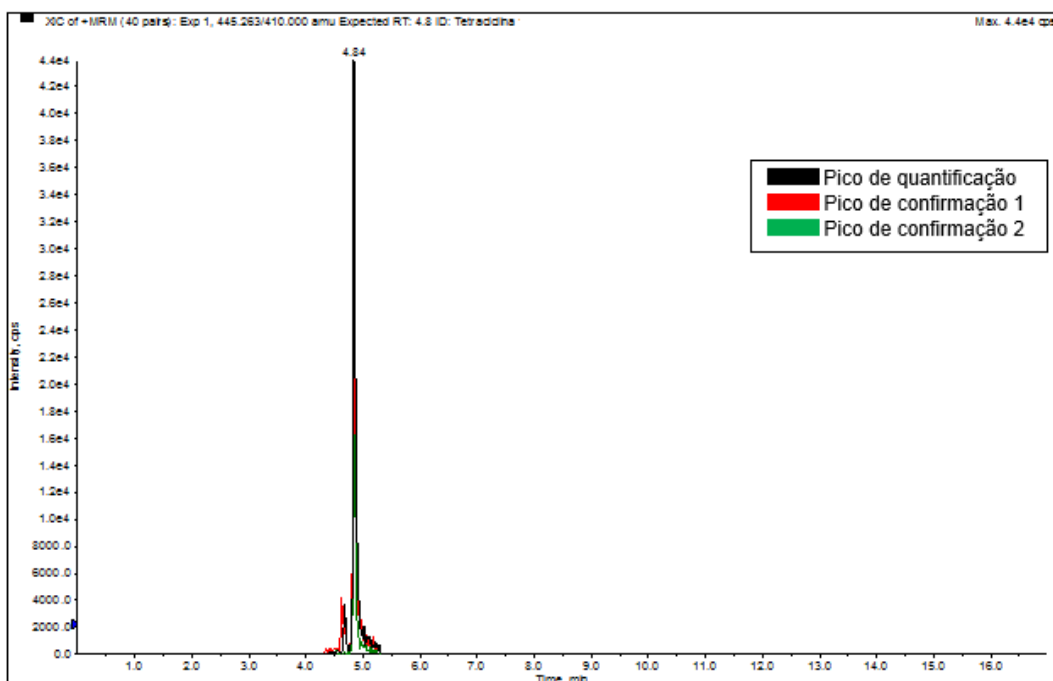


Figura 7c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 445,3/410,0$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 445,3/427,1$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 445,3/154,0$) do padrão de Tetraciclina em solvente - conc. 10ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

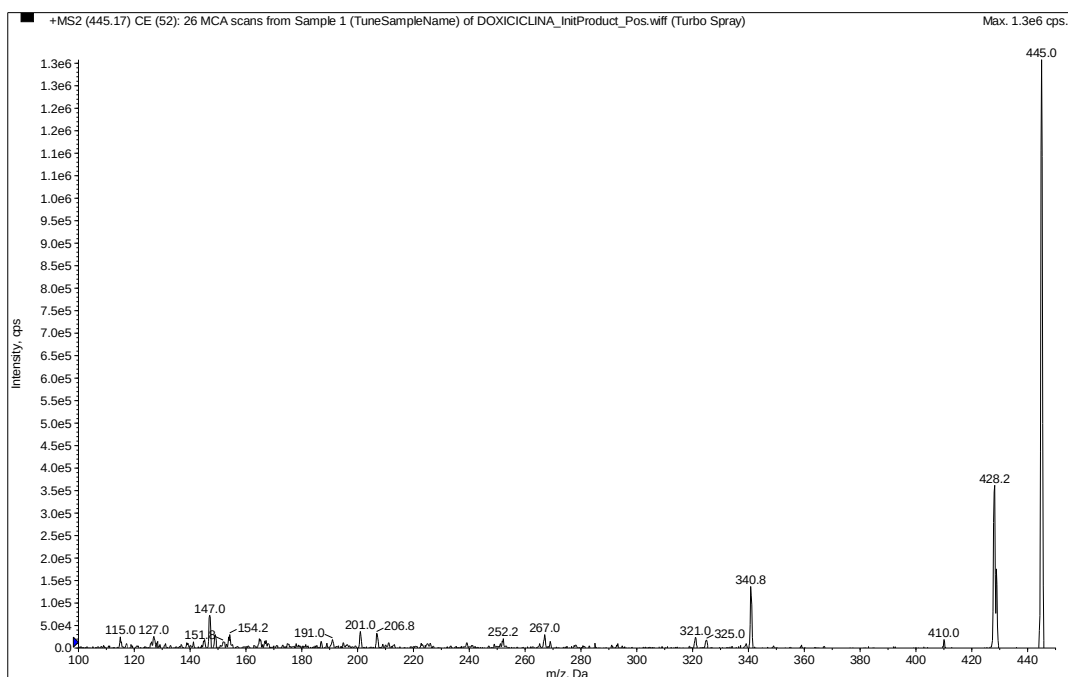


Figura 8a - Scam da doxiciclina para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

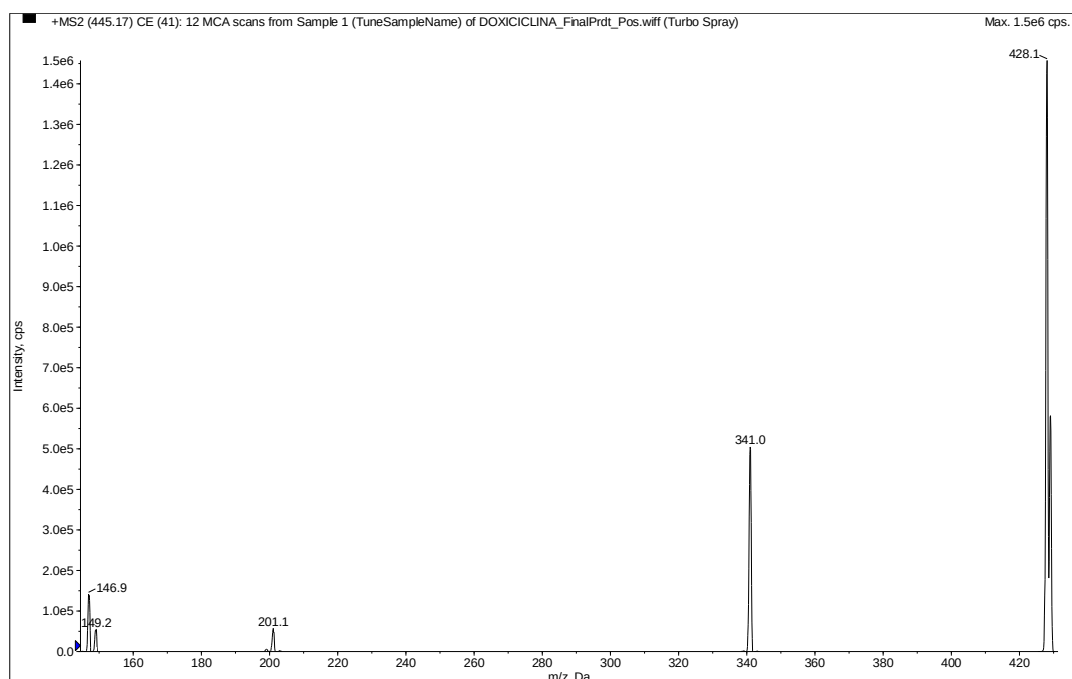


Figura 8b - Scam dos produtos ótimos da doxiciclina em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

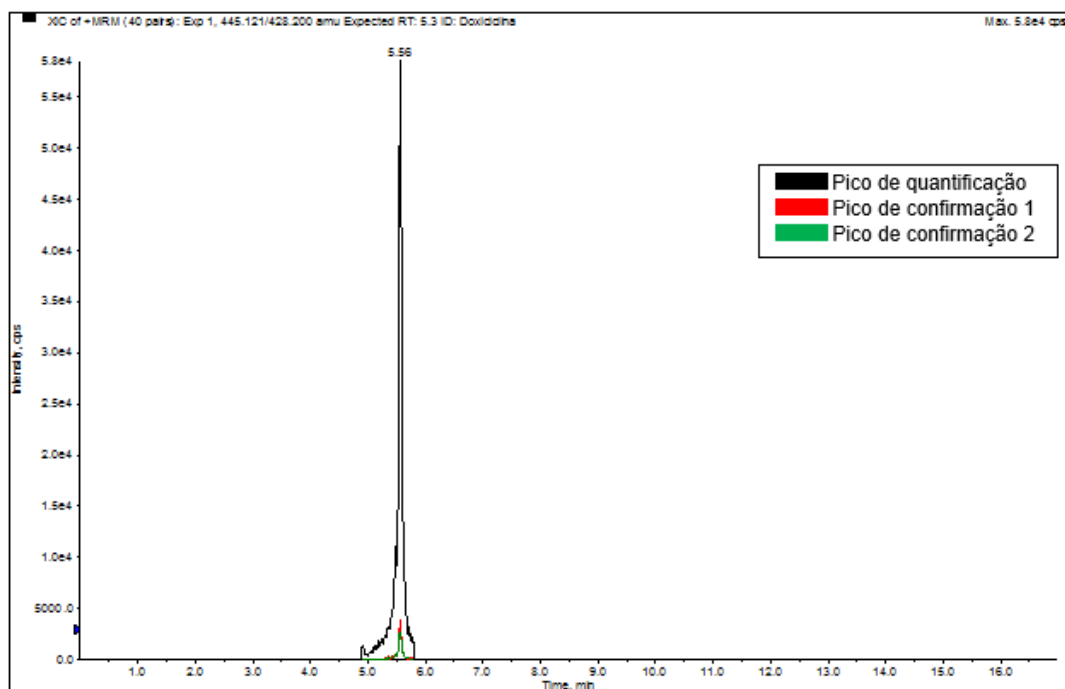


Figura 8c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 445,1/428,2$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 445,1/154,1$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 445,1/267,1$) do padrão de Doxiciclina em solvente - conc. 14ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

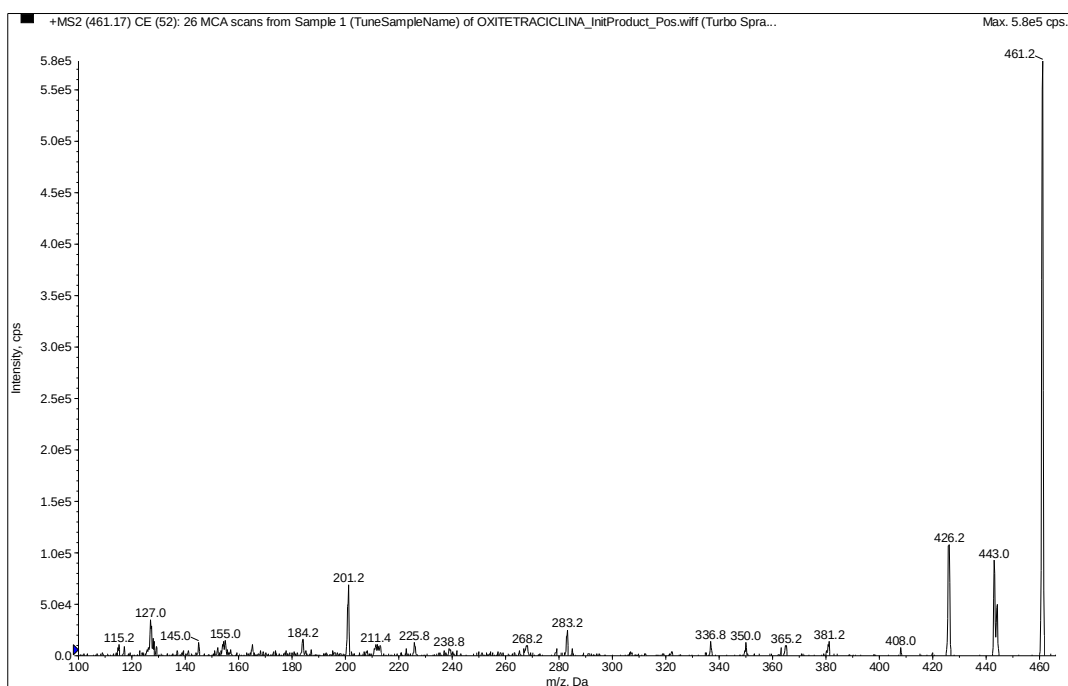


Figura 9a - Scam da oxitetraciclina para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

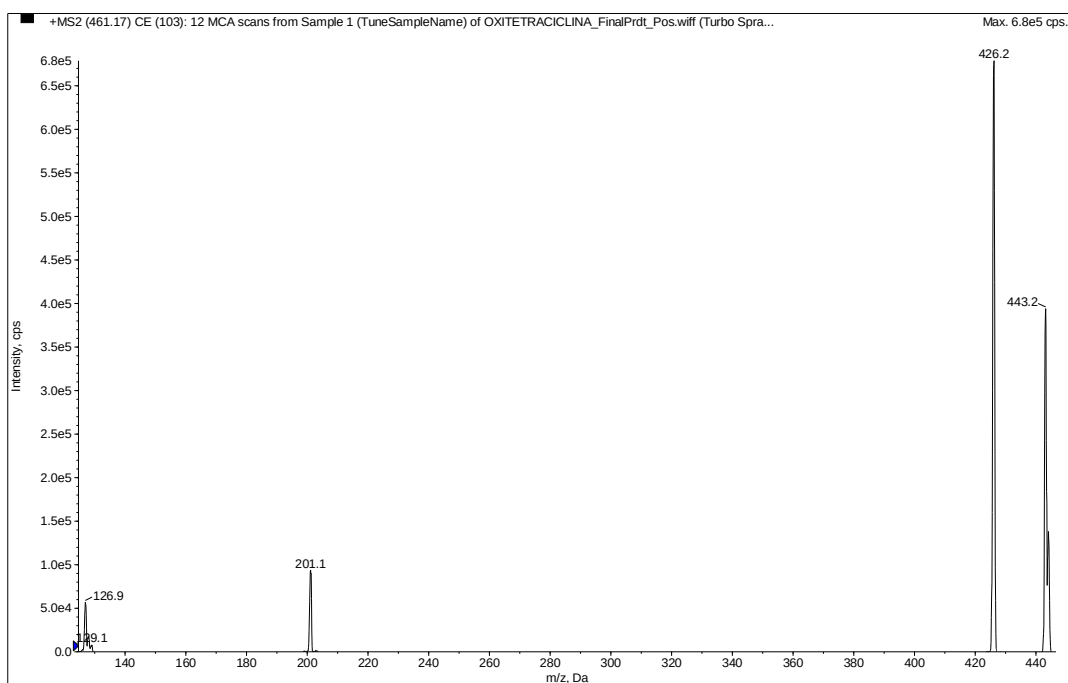


Figura 9b - Scam dos produtos ótimos da oxitetraciclina em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

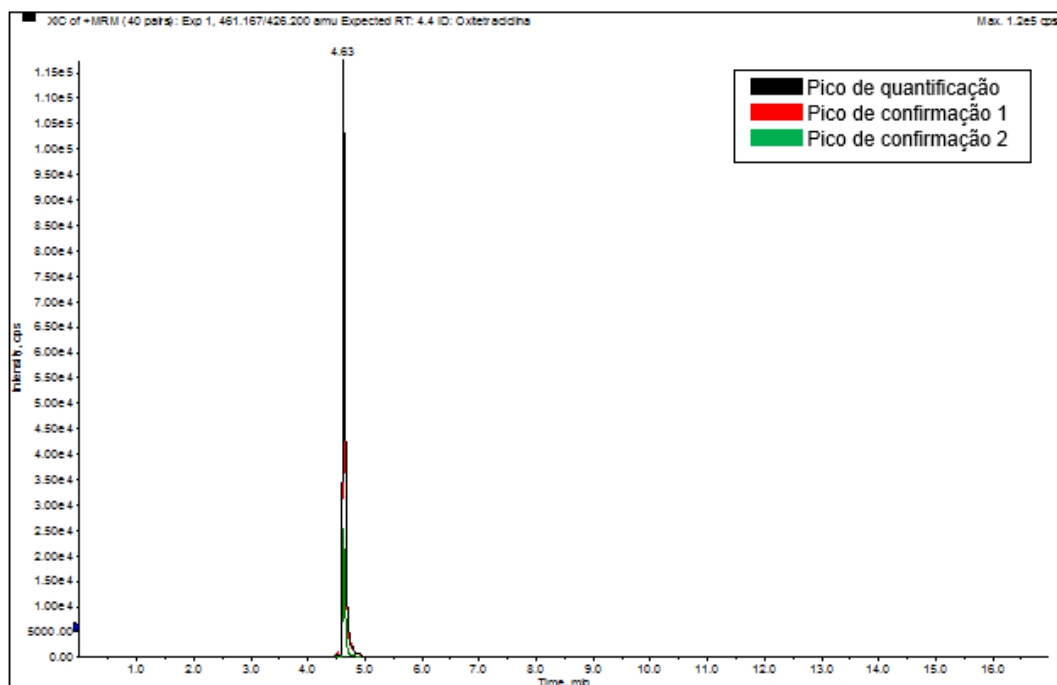


Figura 9c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 461,2/426,2$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 461,2/443,2$) e pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 461,2/443,6$) do padrão de oxitetraciclina em solvente - conc. 18ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

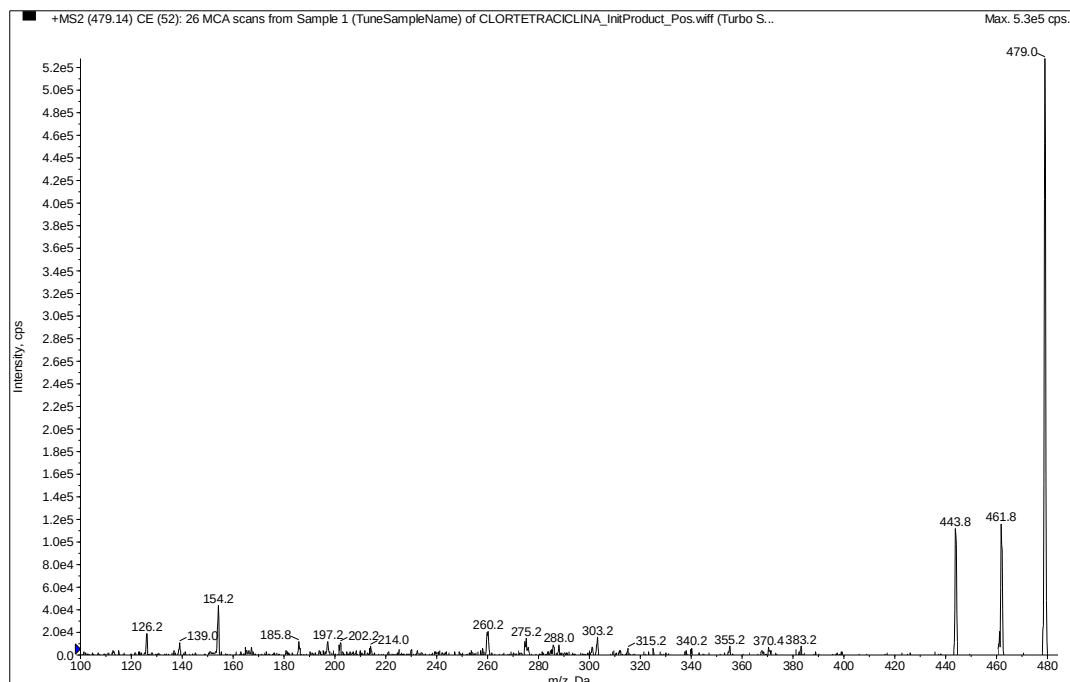


Figura 10a - Scam da clortetraciclina para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

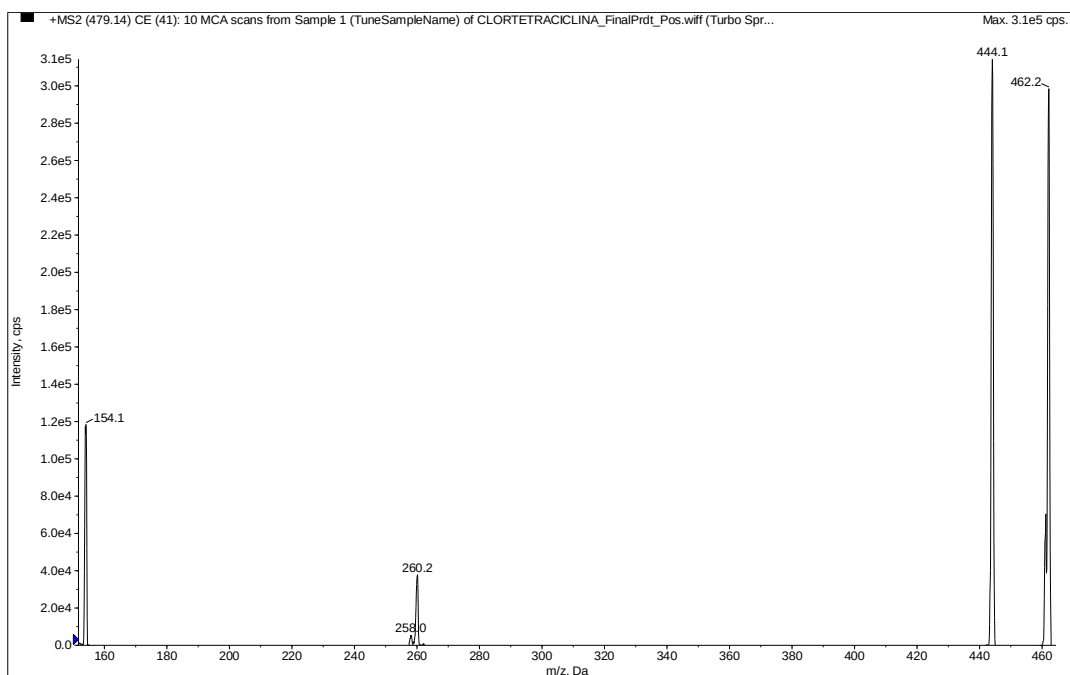


Figura 10b - Scam dos produtos ótimos da clortetraciclina em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

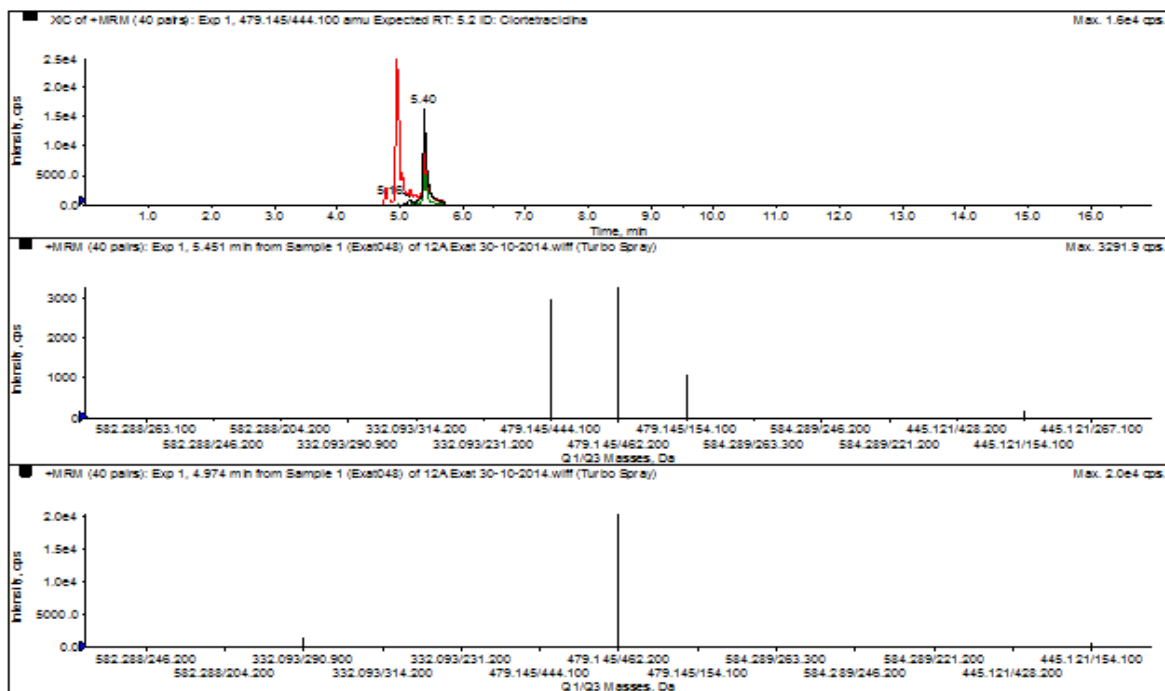


Figura 10c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 479,1/444,1$), pico de confirmação 1 ($Q_1/Q_3 = 479,3/462,2$), pico de confirmação 2 ($Q_1/Q_3 = 479,3/154,1$) e espectro de MRM do padrão de Clortetraciclina em solvente - conc. 16ng/mL– Condições analíticas: ver item 2.

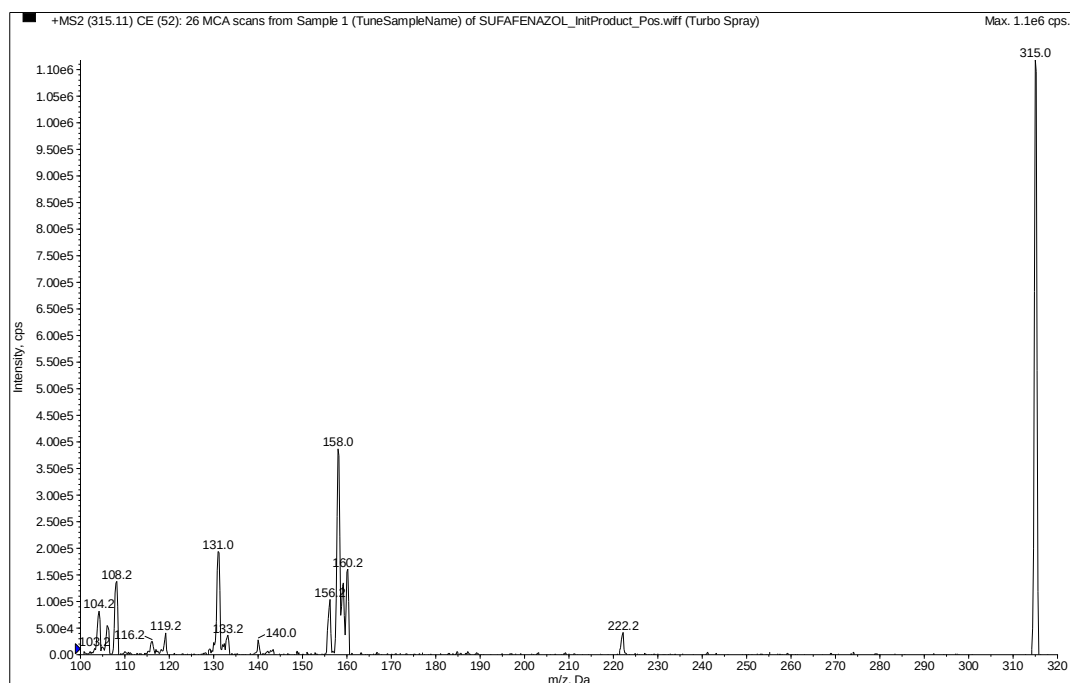


Figura 11a - Scam da sulfafenazol para verificação do íon precursor em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

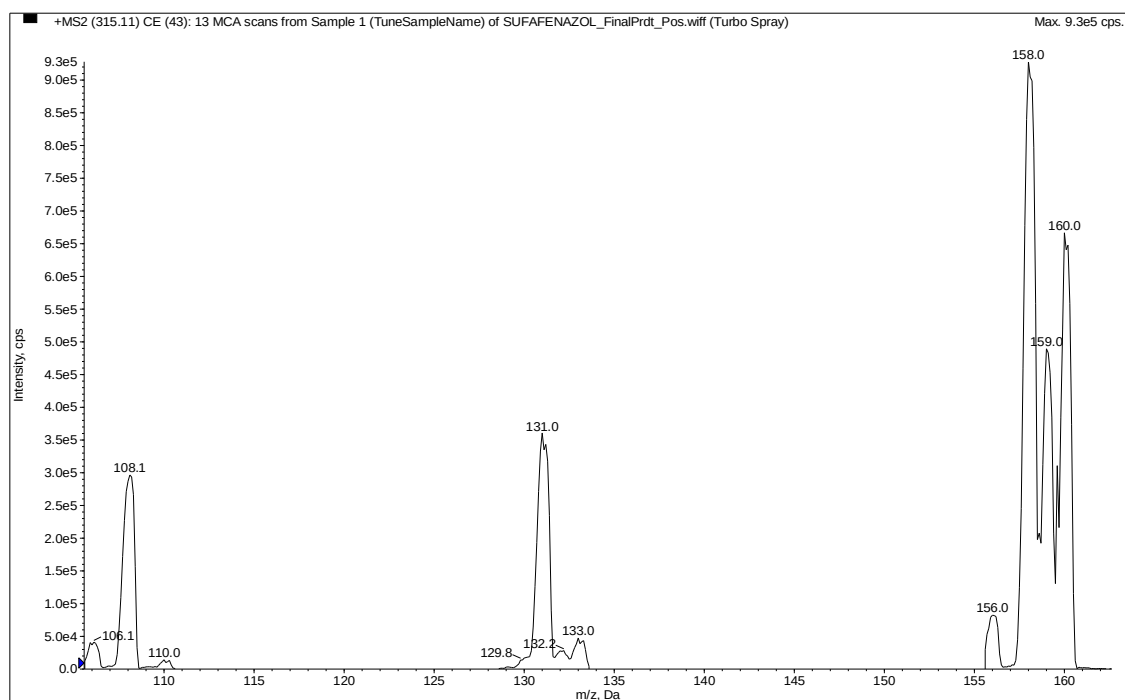


Figura 11b - Scam dos produtos ótimos da sulfafenazol em infusão direta por turbo spray – fase móvel ACN : Ác. Fórmico 0,1% (1:1).

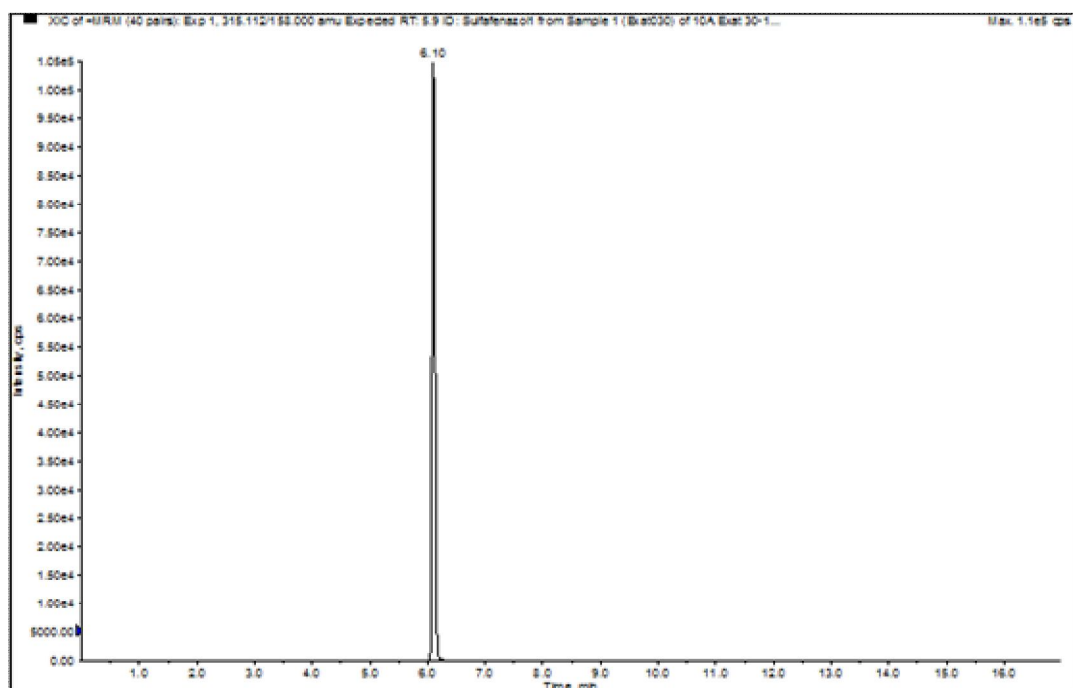


Figura 11c – Pico de quantificação ($Q_1/Q_3 = 315,1/158,0$) do padrão de sulfafenazol (pi) em solvente - conc. 20ng/mL – Condições analíticas: ver item 2.

APÊNDICE B – Tabelas de Avaliação dos Parâmetros de Linearidade da Padronização Externa e Interna dos Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas e Tetraciclinas

Tabela 1 - Avaliação dos parâmetros da linearidade das gentamicinas C₁ e C_{1a}

GENTAMICINA C ₁		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	09	10
Faixa de trabalho	2,70 a 13,5 ng/mL	1,35 a 13,50 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - n° (percentual) e t crítico (t_{vc})	07 (19,4%) t_{vc} = 2,056	08 (20,0%) t_{vc} = 2,045
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e R_{crítico} (R_c)	R_{vc} = 0,9872 <i>p</i> > 0,10 R_c (α 0,05) = 0,9629 resíduos seguem normal	R_{vc} = 0,9843 <i>p</i> > 0,10 R_c (α 0,05) = 0,9657 resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) du > d < 4-du	d = 2,563 du = 1,38 4-du = 2,62 não há autocor. <i>p</i> > 0,1	d = 1,907 du = 1,5 4-du = 2,5 não há autocor. <i>p</i> > 0,1
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos – n° observações (n), variância dos níveis de concentração (S²); t-estatístico de Levene nível significância <i>p</i> > 0,05 t calculado (t_{Lc}) e tabelado (t_{0,975})	n = 29 S² = 7,71 x 10 ⁶ t_{Lc} = -1,483 t_{0,975} = 2,052 <i>p</i> = 0,1497 homocedasticidade	n = 32 S² = 1,8 x 10 ⁰ t_{Lc} = -0,438 t_{0,975} = 2,042 <i>p_c</i> = 0,6644 homocedasticidade
Variância estatística da regressão (<i>p</i> < 0,001) - F calculado (F_{cr}) e <i>p</i> calculado (<i>p_{cr}</i>). Falta de ajuste (<i>p</i> > 0,05) - F calculado (F_{Tfa}) e <i>p</i> calculado (<i>p_{cfa}</i>), F = razão de variâncias <i>p</i> = significância	F_{cr} = 989,05 <i>p_{cr}</i> = 8,3 x 10 ⁻²³ F_{Tfa} = 1,244 <i>p_{fa}</i> = 3,3 x 10 ⁻¹	F_{cr} = 740,7 <i>p_{cr}</i> = 1,1 x 10 ⁻²² F_{Tfa} = 1,86 <i>p_{fa}</i> = 1,2 x 10 ⁻¹
Curva final da linearidade y = ax + b e R ²	a = 8226,4 b = -13856,5 R ² = 0,9734 não há desvio <i>p</i> > 0,05 regressão sig. <i>p</i> < 0,001	a = 2,9841 b = -3,6370 R ² = 0,9611 não há desvio <i>p</i> > 0,05 regressão sig. <i>p</i> < 0,001
GENTAMICINA C _{1A}		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	06	10
Faixa de trabalho	2,60 a 10,4 ng/mL	1,30 a 13,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - n° (percentual) e t crítico (t_{vc})	4 (16,7%) t_{vc} = 2,11	07 (17,5%) t_{vc} = 2,042
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e R_{crítico} (R_c)	R_{vc} = 0,9859 <i>p</i> > 0,10 R_c (α 0,05) = 0,9503 resíduos seguem normal	R_{vc} = 0,9869 <i>p</i> > 0,10 R_c (α 0,05) = 0,9666 resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) du > d < 4-du	d = 1,295 du = 1,29 4-du = 2,71 não há autocor. <i>p</i> > 0,1	d = 1,831 du = 1,51 4-du = 2,49 não há autocor. <i>p</i> > 0,1
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos – n° observações (n), variância dos níveis de concentração (S²); t-estatístico de Levene nível significância <i>p</i> > 0,05 t calculado (t_{Lc}) e tabelado (t_{0,975})	n = 20 S² = 4,05 x 10 ⁶ t_{Lc} = 0,526 t_{0,975} = 2,101 <i>p_c</i> = 0,6056 homocedasticidade	n = 33 S² = 2,81 x 10 ⁰ t_{Lc} = 0,628 t_{0,975} = 2,040 <i>p_c</i> = 0,5347 homocedasticidade
Variância estatística da regressão (<i>p</i> < 0,001) - F calculado (F_{cr}) e <i>p</i> calculado (<i>p_{cr}</i>). Falta de ajuste (<i>p</i> > 0,05) - F calculado (F_{Tfa}) e <i>p</i> calculado (<i>p_{cfa}</i>), F = razão de variâncias <i>p</i> = significância	F_{cr} = 1039,37 <i>p_{cr}</i> = 2,2 x 10 ⁻¹⁷ F_{Tfa} = 7,372 <i>p_{fa}</i> = 2,1 x 10 ⁻³	F_{cr} = 931,7 <i>p_{cr}</i> = 1,1 x 10 ⁻²⁴ F_{Tfa} = 1,3 <i>p_{fa}</i> = 2,0 x 10 ⁻¹
Curva final da linearidade y = ax + b e R ²	a = 10111 b = -6859 R ² = 0,983 Há desvio linear <i>p</i> < 0,002 regressão sig. <i>p</i> < 0,001	a = 4,0550 b = -2,0643 R ² = 0,9678 não há desvio <i>p</i> > 0,05 regressão sig. <i>p</i> < 0,001

Tabela 2 - Avaliação dos parâmetros da linearidade da neomicina e norfloxacino

NEOMICINA		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	06	06
Faixa de trabalho	5 a 25 ng/mL	5 a 25 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - n^o (percentual) e t crítico (t_{vc})	02 (8,3%) $t_{vc} = 2,093$	03 (12,5%) $t_{vc} = 2,101$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{crítico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9687$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9538$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9911$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9521$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 2,371$ $du = 1,43$ $4-du = 2,57$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 1,771$ $du = 1,42$ $4-du = 2,58$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos - n^o observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 22$ $S^2 = 8,41 \times 10^5$ $t_{Lc} = -0,316$ $t_{0,975} = 2,086$ $p = 0,7552$ homocedasticidade	$n = 21$ $S^2 = 4,26 \times 10^{-2}$ $t_{Lc} = -0,985$ $t_{0,975} = 2,093$ $p_c = 0,3371$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias $p =$ significância	$F_{cr} = 166,85$ $p_{cr} = 3,7 \times 10^{-11}$ $F_{Tfa} = 0,740$ $p_{fa} = 5,8 \times 10^{-1}$	$F_{cr} = 280,72$ $p_{cr} = 7,8 \times 10^{-13}$ $F_{Tfa} = 2,139$ $p_{fa} = 1,3 \times 10^{-1}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 565,3$ $b = 329,4$ $R^2 = 0,893$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 0,2036$ $b = -0,2718$ $R^2 = 0,9366$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$
NORFLOXACINO		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	06	9
Faixa de trabalho	0,3 a 14,0 ng/mL	2 a 20,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - n^o (percentual) e t crítico (t_{vc})	3 (12,5%) $t_{vc} = 2,101$	08 (22,2%) $t_{vc} = 2,060$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{crítico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9726$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9521$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9735$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9618$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 1,569$ $du = 1,43$ $4-du = 2,57$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 1,468$ $du = 1,37$ $4-du = 2,63$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos - n^o observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 21$ $S^2 = 2,42 \times 10^8$ $t_{Lc} = -1,203$ $t_{0,975} = 2,093$ $p = 0,2439$ homocedasticidade	$n = 28$ $S^2 = 6,75 \times 10^2$ $t_{Lc} = -0,975$ $t_{0,975} = 2,056$ $p_c = 0,3386$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias $p =$ significância	$F_{cr} = 39633,51$ $p_{cr} = 5,3 \times 10^{-33}$ $F_{Tfa} = 4,163$ $p_{fa} = 1,8 \times 10^{-2}$	$F_{cr} = 3166,5$ $p_{cr} = 1,1 \times 10^{-28}$ $F_{Tfa} = 2,535$ $p_{fa} = 5,1 \times 10^{-2}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 265145,6$ $b = -34779,5$ $R^2 = 0,9995$ Há desvio linear $p < 0,018$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 89,6578$ $b = -38,8035$ $R^2 = 0,9919$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros da linearidade do enrofloxacino e ciprofloxacino

ENROFLOXACINO		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	07	9
Faixa de trabalho	2 a 14,0 ng/mL	0,3 a 14,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - nº (percentual) e t crítico (t_{vc})	0 (0%) $t_{vc} = 2,060$	2 (5,6%) $t_{vc} = 2,040$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{crítico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9913$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9618$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9857$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9674$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 1,511$ $du = 1,48$ $4-du = 2,52$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 2,239$ $du = 1,51$ $4-du = 2,49$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos – nº observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 28$ $S^2 = 3,23 \times 10^8$ $t_{Lc} = -0,792$ $t_{0,975} = 2,056$ $p = 0,4336$ homocedasticidade	$n = 34$ $S^2 = 1,75 \times 10^1$ $t_{Lc} = -1,086$ $t_{0,975} = 2,259$ $p_c = 0,2172$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias $p =$ significância	$F_{cr} = 1887,68$ $p_{cr} = 8,4 \times 10^{-26}$ $F_{Tfa} = 1,476$ $p_{fa} = 2,4 \times 10^{-1}$	$F_{cr} = 5193,21$ $p_{cr} = 5,5 \times 10^{-37}$ $F_{Tfa} = 0,253$ $p_{fa} = 9,7 \times 10^{-1}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 61821,4$ $b = -21428,6$ $R^2 = 0,9864$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 17,1116$ $b = -2,1294$ $R^2 = 0,9939$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$
CIPROFLOXACINO		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	8	9
Faixa de trabalho	2 a 16 ng/mL	1 a 18,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - nº (percentual) e t crítico (t_{vc})	3 (9,4%) $t_{vc} = 2,052$	7 (19,4%) $t_{vc} = 2,056$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{crítico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9826$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9629$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9902$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9629$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 1,848$ $du = 1,48$ $4-du = 2,52$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 2,041$ $du = 1,48$ $4-du = 2,52$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos – nº observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 29$ $S^2 = 7,97 \times 10^8$ $t_{Lc} = -0,566$ $t_{0,975} = 2,052$ $p = 0,5760$ homocedasticidade	$n = 29$ $S^2 = 6,08 \times 10^1$ $t_{Lc} = -0,849$ $t_{0,975} = 2,052$ $p_c = 0,4032$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias $p =$ significância	$F_{cr} = 1980,62$ $p_{cr} = 8,4 \times 10^{-27}$ $F_{Tfa} = 2,564$ $p_{fa} = 5,1 \times 10^{-2}$	$F_{cr} = 5035,07$ $p_{cr} = 3,15 \times 10^{-32}$ $F_{Tfa} = 1,085$ $p_{fa} = 4,09 \times 10^{-1}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 91896,5$ $b = -77838,8$ $R^2 = 0,9866$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 25,2559$ $b = -9,4316$ $R^2 = 0,9947$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$

Tabela 4 - Avaliação dos parâmetros da linearidade da tetraciclina e oxitetraciclina

TETRACICLINA		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	07	9
Faixa de trabalho	0,5 a 12 ng/mL	2 a 18,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - n^o (percentual) e t crítico (t_{vc})	6 (21,4%) $t_{vc} = 2,093$	0 (0%) $t_{vc} = 2,035$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{critico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9780$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9538$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9906$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9689$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 1,219$ $du = 1,17$ $4-du = 2,83$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 2,332$ $du = 1,53$ $4-du = 2,47$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos - n^o observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 22$ $S^2 = 2,17 \times 10^7$ $t_{Lc} = -0,647$ $t_{0,975} = 2,086$ $p = 0,5251$ homocedasticidade	$n = 36$ $S^2 = 3,98 \times 10^1$ $t_{Lc} = -1,285$ $t_{0,975} = 2,032$ $p_c = 0,2073$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias p = significância	$F_{cr} = 9609,91$ $p_{cr} = 2,6 \times 10^{-28}$ $F_{Tfa} = 2,3$ $p_{fa} = 4,01 \times 10^{-2}$	$F_{cr} = 975,91$ $p_{cr} = 1,27 \times 10^{-26}$ $F_{Tfa} = 0,855$ $p_{fa} = 5,53 \times 10^{-1}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 36167,4$ $b = 3452,8$ $R^2 = 0,9978$ Há desvio linear $p < 0,04$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 10,71243$ $b = -0,5761$ $R^2 = 0,9663$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$
OXITETRACICLINA		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	8	9
Faixa de trabalho	2 a 16 ng/mL	1 a 18,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - n^o (percentual) e t crítico (t_{vc})	6 (18,8%) $t_{vc} = 2,069$	7 (19,4%) $t_{vc} = 2,056$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{critico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9759$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9595$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9926$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9629$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 2,190$ $du = 1,46$ $4-du = 2,54$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 2,138$ $du = 1,48$ $4-du = 2,52$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos - n^o observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 26$ $S^2 = 3,44 \times 10^8$ $t_{Lc} = -1,231$ $t_{0,975} = 2,064$ $p = 0,2302$ homocedasticidade	$n = 29$ $S^2 = 6,37 \times 10^1$ $t_{Lc} = -1,904$ $t_{0,975} = 2,052$ $p_c = 0,0676$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias p = significância	$F_{cr} = 2633,33$ $p_{cr} = 4,8 \times 10^{-26}$ $F_{Tfa} = 1,528$ $p_{fa} = 2,3 \times 10^{-1}$	$F_{cr} = 2793,84$ $p_{cr} = 8,5 \times 10^{-29}$ $F_{Tfa} = 1,538$ $p_{fa} = 2,1 \times 10^{-1}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 70013,4$ $b = -26562,4$ $R^2 = 0,991$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 17,1116$ $b = -2,1294$ $R^2 = 0,9904$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$

Tabela 5 - Avaliação dos parâmetros da linearidade clortetraciclina e doxíciclina

CLORTETRACICLINA		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	8	10
Faixa de trabalho	0,5 a 16 ng/mL	1 a 16,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - nº (percentual) e t crítico (t_{vc})	1 (3,1%) $t_{vc} = 2,048$	6 (15%) $t_{vc} = 2,040$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{crítico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9889$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,1) = 0,9648$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9797$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9674$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 1,803$ $du = 1,5$ $4-du = 2,5$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 1,641$ $du = 1,51$ $4-du = 2,49$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos – nº observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 31$ $S^2 = 4,54 \times 10^6$ $t_{Lc} = -0,904$ $t_{0,975} = 2,101$ $p = 0,3734$ homocedasticidade	$n = 34$ $S^2 = 1,52 \times 10^0$ $t_{Lc} = -1,117$ $t_{0,975} = 0,2721$ $p_c = 0,2172$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias $p =$ significância	$F_{cr} = 859,21$ $p_{cr} = 2,0 \times 10^{-37}$ $F_{Tfa} = 2,13$ $p_{fa} = 8,9 \times 10^{-2}$	$F_{cr} = 3184,46$ $p_{cr} = 1,3 \times 10^{-33}$ $F_{Tfa} = 1,023$ $p_{fa} = 4,46 \times 10^{-1}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 10013,3$ $b = 4048,8$ $R^2 = 0,9966$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 3,2172$ $b = -1,3181$ $R^2 = 0,9901$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$
DOXICICLINA		
Parâmetros avaliados	Padronização externa	Padronização interna
Nº de pontos da curva	10	10
Faixa de trabalho	2 a 20 ng/mL	1 a 18,00 ng/mL
Teste Jackknife (J_{ei}) para valores discrepantes Jackknife (J_{ei}) - nº (percentual) e t crítico (t_{vc})	7 (17,5%) $t_{vc} = 2,042$	7 (17,5%) $t_{vc} = 2,042$
Teste de normalidade de resíduos - valor do coeficiente de correlação Ryan-Joiner (R_{vc}) e $R_{crítico}$ (R_c)	$R_{vc} = 0,9678$ $p > 0,05$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9666$ resíduos seguem normal	$R_{vc} = 0,9833$ $p > 0,10$ $R_c(\alpha 0,05) = 0,9666$ resíduos seguem normal
Teste de Durbin-Watson autocorrelação de resíduos, valores críticos (du e 4-du) valor calculado (d) $du > d < 4-du$	$d = 2,318$ $du = 1,51$ $4-du = 2,49$ não há autocor. $p > 0,1$	$d = 1,537$ $du = 1,51$ $4-du = 2,49$ não há autocor. $p > 0,1$
Teste de Levene modificado para homogeneidade da variância de resíduos – nº observações (n), variância dos níveis de concentração (S^2); t-estatístico de Levene nível significância $p > 0,05$ tcalculado(t_{Lc}) e tabelado ($t_{0,975}$)	$n = 33$ $S^2 = 6,30 \times 10^7$ $t_{Lc} = -0,041$ $t_{0,975} = 2,040$ $p = 0,9676$ homocedasticidade	$n = 33$ $S^2 = 5,97 \times 10^0$ $t_{Lc} = 0,069$ $t_{0,975} = 2,040$ $p_c = 0,9458$ homocedasticidade
Variância estatística da regressão ($p < 0,001$) - F calculado (F_{cr}) e p calculado (p_{cr}). Falta de ajuste ($p > 0,05$) - F calculado (F_{Tfa}) e p calculado (p_{cfa}), F = razão de variâncias $p =$ significância	$F_{cr} = 5716,55$ $p_{cr} = 9,9 \times 10^{-37}$ $F_{Tfa} = 0,781$ $p_{fa} = 6,2 \times 10^{-1}$	$F_{cr} = 4569,7$ $p_{cr} = 3,1 \times 10^{-35}$ $F_{Tfa} = 2,267$ $p_{fa} = 5,96 \times 10^{-2}$
Curva final da linearidade $y = ax + b$ e R^2	$a = 28854,8$ $b = 17037,8$ $R^2 = 0,9946$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$	$a = 8,4555$ $b = 2,4555$ $R^2 = 0,9933$ não há desvio $p > 0,05$ regressão sig. $p < 0,001$

APÊNDICE C – Tabelas de Avaliação dos Parâmetros de Efeito Matriz da Padronização Externa e Interna dos Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas e Tetraciclinas

Tabela 1 - Avaliação dos parâmetros do efeito matriz para gentamicina C₁, gentamicina C_{1a} e neomicina

Analito	Equação da reta ($y = ax + b$), R^2 , ptos (quaduplicata ou triplicata), n		Faixa trabalho	Teste de F da homocedasticidade	Teste de t p/ comparação do $t_{crítico}$ c/ os calculados inclinação (t_a) e interseção (t_b)			Conclusão
	em solvente	em matriz			$t_{crítico}$	t_a	t_b	
Gentamicina C ₁ PE	a = 11424,6531 b = -27857,6109 $R^2 = 0,9400$ ptos = 6 (3) n = 15	a = 21486,912 b = 9904,7186 $R^2 = 0,9851$ ptos = 5 (4) n = 16	5,40 ng/mL a 14,85 ng/mL	$F_{crítico} = 2,5073$ $F_{calc.} = 1,0525$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0518	9,4454 Há efeito matriz	3,3099 Há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo e aditivo
Gentamicina C ₁ PI	a = 5,0503 b = -9,5271 $R^2 = 0,9745$ ptos = 6 (3) n = 15	a = 8,0681 b = 12,2496 $R^2 = 0,9530$ ptos = 6 (3) n = 15	5,40 ng/mL a 14,85 ng/mL	$F_{crítico} = 2,5769$ $F_{calc.} = 4,6623$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,1009	5,5287 Há efeito matriz	3,6259 Há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo e aditivo
Gentamicina C _{1a} PE	a = 16773,5514 b = -41805,9336 $R^2 = 0,8933$ ptos = 6 (4) n = 21	a = 20019,166 b = -7338,319 $R^2 = 0,9462$ ptos = 6 (4) n = 21	5,2 ng/mL a 13,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,1683$ $F_{calc.} = 1,5479$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0244	1,8789 Não há efeito matriz	2,1725 Há efeito matriz	Efeito matriz aditivo
Gentamicina C _{1a} PI	a = 8,6318 b = -22,6202 $R^2 = 0,9546$ ptos = 4 (4) n = 16	a = 8,6785 b = -3,4689 $R^2 = 0,9333$ ptos = 6 (4) n = 22	5,20 ng/mL a 13,00 ng/mL	$F_{crítico} = 2,3879$ $F_{calc.} = 1,1999$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0322	0,0639 Não há efeito matriz	2,8237 Há efeito matriz	Efeito matriz aditivo
Neomicina PE	a = 1570,2420 b = -5119,2317 $R^2 = 0,9271$ ptos = 6 (4) n = 19	a = 2920,2241 b = -1860,839 $R^2 = 0,9829$ ptos = 6 (4) n = 20	5,0 ng/mL a 25,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,2325$ $F_{calc.} = 1,4841$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0301	9,6190 Há efeito matriz	1,5306 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Neomicina PI	a = 2,1459 b = -4,4624 $R^2 = 0,9533$ ptos = 6 (3) n = 17	a = 1,3085 b = -1,0404 $R^2 = 0,9550$ ptos = 6 (4) n = 21	5,0 ng/mL a 25,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,2341$ $F_{calc.} = 3,2874$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0739	6,0324 Há efeito matriz	1,6139 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo

Ptos = número total níveis considerados para cada antibiótico.

Tabela 2 - Avaliação dos parâmetros do efeito matriz para norfloxacino, enrofloxacino e ciprofloxacino

Analito	Equação da reta ($y = ax + b$), R^2 , ptos (quaduplicata ou triplicata), n		Faixa trabalho	Teste de F da homocedasticidade	Teste de t p/ comparação do $t_{\text{crítico}}$ c/ os calculados inclinação (t_a) e interseção (t_b)			Conclusão
	em solvente	em matriz			$t_{\text{crítico}}$	t_a	t_b	
Norfloxacino PE	$a = 135406,514$ $b = -28215,938$ $R^2 = 0,9978$ ptos = 6 (3) n = 18	$a = 16997,527$ $b = -7834,007$ $R^2 = 0,9953$ ptos = 6 (4) n = 24	0,30 ng/mL a 16,0 ng/mL	$F_{\text{crítico}} = 2,2538$ $F_{\text{calc.}} = 3,3417$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0301	11,6853 Há efeito matriz	0,8030 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Norfloxacino PI	$a = 6,6313$ $b = -1,4920$ $R^2 = 0,9988$ ptos = 6 (3) n = 15	$a = 6,5910$ $b = 0,5794$ $R^2 = 0,9990$ ptos = 6 (4) n = 19	0,30 ng/mL a 16,0 ng/mL	$F_{\text{crítico}} = 2,3531$ $F_{\text{calc.}} = 1,2879$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0423	1,7063 Não há efeito matriz	3,4064 Há efeito matriz	Efeito matriz aditivo
Enrofloxacin PE	$a = 30533,8234$ $b = -1922,9485$ $R^2 = 0,9991$ ptos = 5 (4) n = 17	$a = 79888,027$ $b = -40230,24$ $R^2 = 0,9536$ ptos = 6 (4) n = 21	0,3 ng/mL a 14,0 ng/mL	$F_{\text{crítico}} = 2,3398$ $F_{\text{calc.}} = 268,7832$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0930	12,1877 Há efeito matriz	1,3093 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Enrofloxacin PI	$a = 10,7888$ $b = -0,0213$ $R^2 = 0,9959$ ptos = 6 (4) n = 20	$a = 17,3509$ $b = -2,7567$ $R^2 = 0,9665$ ptos = 6 (3) n = 15	0,3 ng/mL a 14,0 ng/mL	$F_{\text{crítico}} = 2,3143$ $F_{\text{calc.}} = 28,8829$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,1604	7,2090 Há efeito matriz	0,3778 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Ciprofloxacino PE	$a = 49237,4144$ $b = -4371,4309$ $R^2 = 0,9981$ ptos = 6 (4) n = 21	$a = 144032,17$ $b = -20311,48$ $R^2 = 0,9855$ ptos = 6 (3) n = 16	0,3 ng/mL a 14,0 ng/mL	$F_{\text{crítico}} = 2,2556$ $F_{\text{calc.}} = 53,0298$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,1448	20,2168 Há efeito matriz	0,4803 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Ciprofloxacino PI	$a = 18,0110$ $b = -0,6738$ $R^2 = 0,9994$ ptos = 6 (4) n = 19	$a = 34,6554$ $b = 1,6149$ $R^2 = 0,9972$ ptos = 6 (3) n = 16	0,3 ng/mL a 14,0 ng/mL	$F_{\text{crítico}} = 2,3290$ $F_{\text{calc.}} = 13,81$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,1315	33,0107 Há efeito matriz	0,6399 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo

Ptos = número total níveis considerados para cada antibiótico.

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros do efeito matriz para a doxiciclina, tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina

Analito	Equação da reta ($y = ax + b$), R^2 , ptos (quaduplicata ou triplicata), n		Faixa trabalho	Teste de F da homocedasticidade	Teste de t p/ comparação do $t_{crítico}$ c/ os calculados inclinação (t_a) e interseção (t_b)			Conclusão
	em solvente	em matriz			$t_{crítico}$	t_a	t_b	
Doxiciclina PE	$a = 18067,4688$ $b = -530,7094$ $R^2 = 0,9991$ ptos = 6 (4); n = 19	$a = 15513,609$ $b = 2165,5580$ $R^2 = 0,9987$ ptos = 5 (4); n = 17	0,3 ng/mL a 14,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,3077$ $F_{calc.} = 1,2232$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0369	13,2887 Há efeito matriz	1,7066 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Doxiciclina PI	$a = 6,6993$ $b = -0,4772$ $R^2 = 0,9960$ ptos = 6 (4); n = 24	$a = 6,2769$ $b = 1,8451$ $R^2 = 0,9887$ ptos = 6 (4); n = 22	0,3 ng/mL a 14,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,0707$ $F_{calc.} = 2,7482$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0369	2,4143 Há efeito matriz	1,6196 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Tetraciclina PE	$a = 17153,8897$ $b = -700,7533$ $R^2 = 0,9986$ ptos = 6 (3); n = 15	$a = 22493,764$ $b = 208,8795$ $R^2 = 0,9979$ ptos = 6 (4); n = 20	0,3 ng/mL a 10,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,4841$ $F_{calc.} = 2,5913$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0423	17,6174 Há efeito matriz	0,6604 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Tetraciclina PI	$a = 8,4588$ $b = -0,9358$ $R^2 = 0,9972$ ptos = 6 (3); n = 15	$a = 9,1656$ $b = 0,6272$ $R^2 = 0,9965$ ptos = 6 (4); n = 19	0,3 ng/mL a 10,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,4987$ $F_{calc.} = 1,5586$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0423	3,7514 Há efeito matriz	1,7978 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Oxitetraciclina PE	$a = 32583,3186$ $b = -2238,3857$ $R^2 = 0,9889$ ptos = 6 (3); n = 17	$a = 54124,617$ $b = -791,7763$ $R^2 = 0,9990$ ptos = 6 (4); n = 21	0,3 ng/mL a 18,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,2341$ $F_{calc.} = 4,0663$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0860	22,0257 Há efeito matriz	0,1667 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Oxitetraciclina PI	$a = 14,8666$ $b = -1,0849$ $R^2 = 0,9973$ ptos = 6 (4); n = 20	$a = 21,0320$ $b = 1,7808$ $R^2 = 0,9990$ ptos = 6 (3); n = 15	0,3 ng/mL a 18,0 ng/mL	$F_{crítico} = 2,4841$ $F_{calc.} = 1,3987$ Homocedasticidade Variâncias combinadas	2,0395	23,1035 Há efeito matriz	1,2089 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo
Clortetraciclina PE	$a = 3873,7912$ $b = 490,9293$ $R^2 = 0,999$ ptos = 6 (3); n = 14	$a = 4031,2843$ $b = 631,4275$ $R^2 = 0,993$ ptos = 6 (4); n = 20	0,3 ng/mL a 16 ng/mL	$F_{crítico} = 2,5684$ $F_{calc.} = 7,6782$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0639	1,7957 Não há efeito matriz	0,2003 Não há efeito matriz	Não há efeito matriz
Clortetraciclina PI	$a = 1,7433$ $b = -0,3179$ $R^2 = 0,9860$ Ptos = 5 (4); n = 16	$a = 1,5227$ $b = 0,5563$ $R^2 = 0,9964$ Pto s = 6 (3); n = 16	0,3 ng/mL a 16 ng/mL	$F_{crítico} = 2,4837$ $F_{calc.} = 4,7423$ Heterocedasticidade Variâncias distintas	2,0930	3,6423 Há efeito matriz	1,8923 Não há efeito matriz	Efeito matriz multiplicativo

Ptos = número total níveis considerados para cada antibiótico.

APÊNDICE D – Perfis Cromatográficos de Quantificação de Resíduos de Antibióticos em Uma Amostra de Leite em Pó

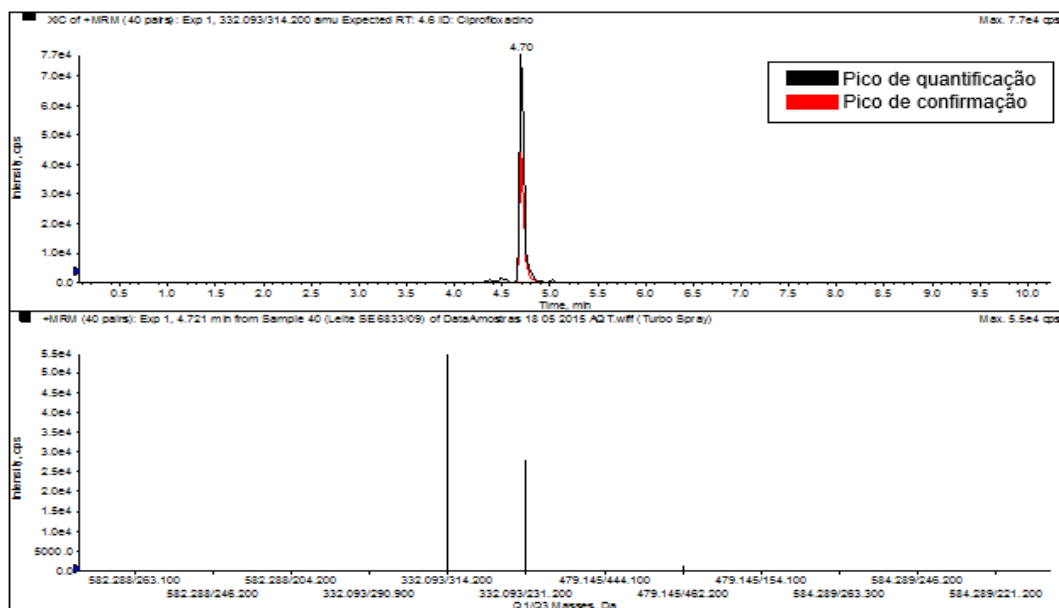


Figura 1 - Amostra de leite em pó integral positiva para Ciprofloxacino. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 = 332,1/314,2$ e Pico de confirmação $Q_1/Q_2 = 332,1/231,2$) – conc. 9,70 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.

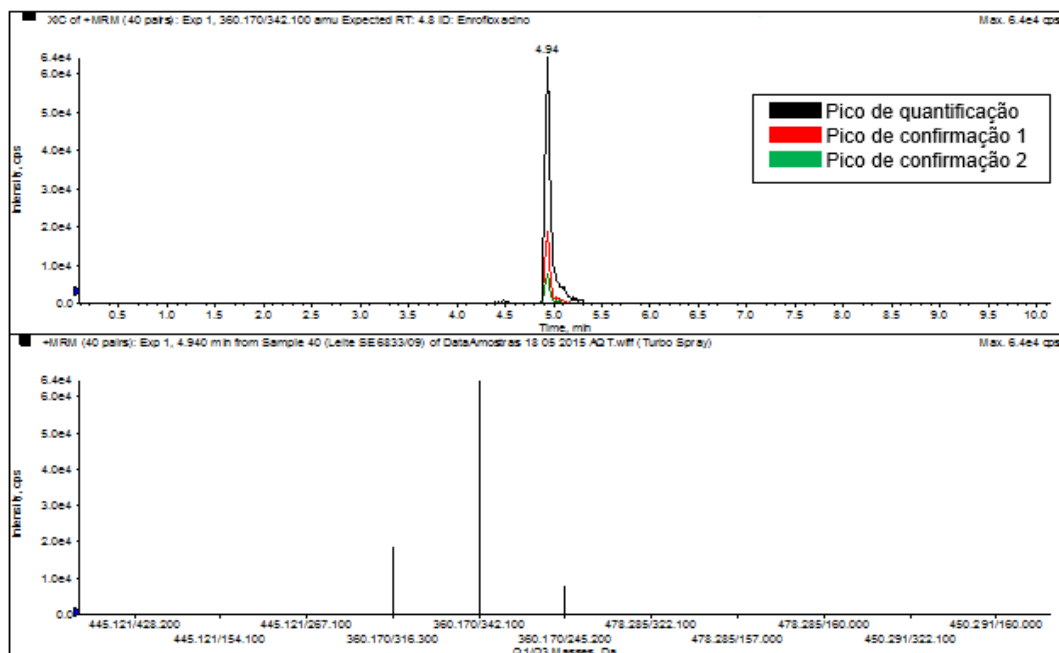


Figura 2 - Amostra de leite em pó integral positiva para Enrofloxacino. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 = 360,2/342,1$, Pico de confirmação 1 $Q_1/Q_2 = 360,2/216,3$ e Pico de confirmação 2 $Q_1/Q_2 = 360,2/245,2$) – conc. 20,36 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.

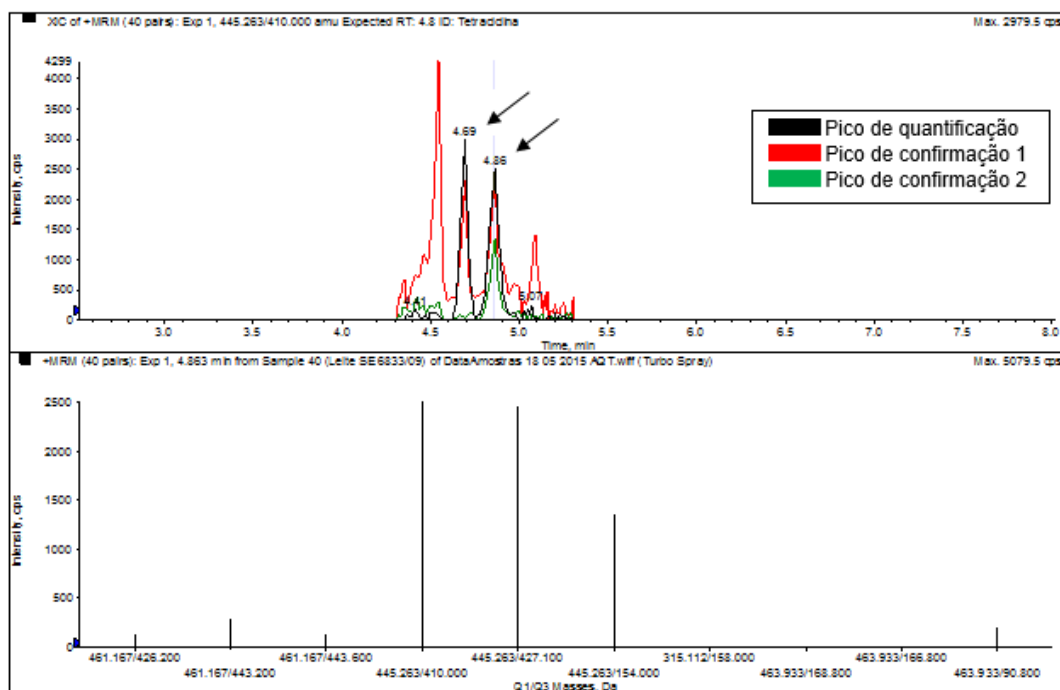


Figura 3 - Amostra de leite em pó integral positiva para Tetraciclina. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 =$, Pico de confirmação 1 $Q_1/Q_2 =$ e Pico de confirmação 2 $Q_1/Q_2 =$) – conc. 2,20 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.

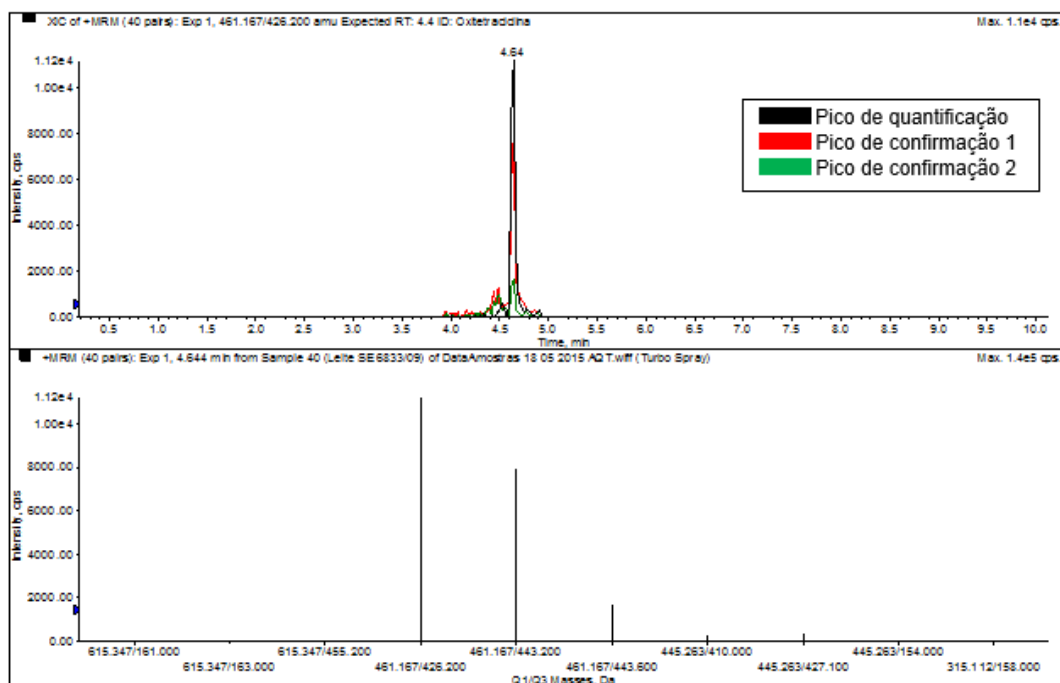


Figura 4 - Amostra de leite em pó integral positiva para Oxitetraciclina. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 =$, Pico de confirmação 1 $Q_1/Q_2 =$ e Pico de confirmação 2 $Q_1/Q_2 =$) – conc. 3,93 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.

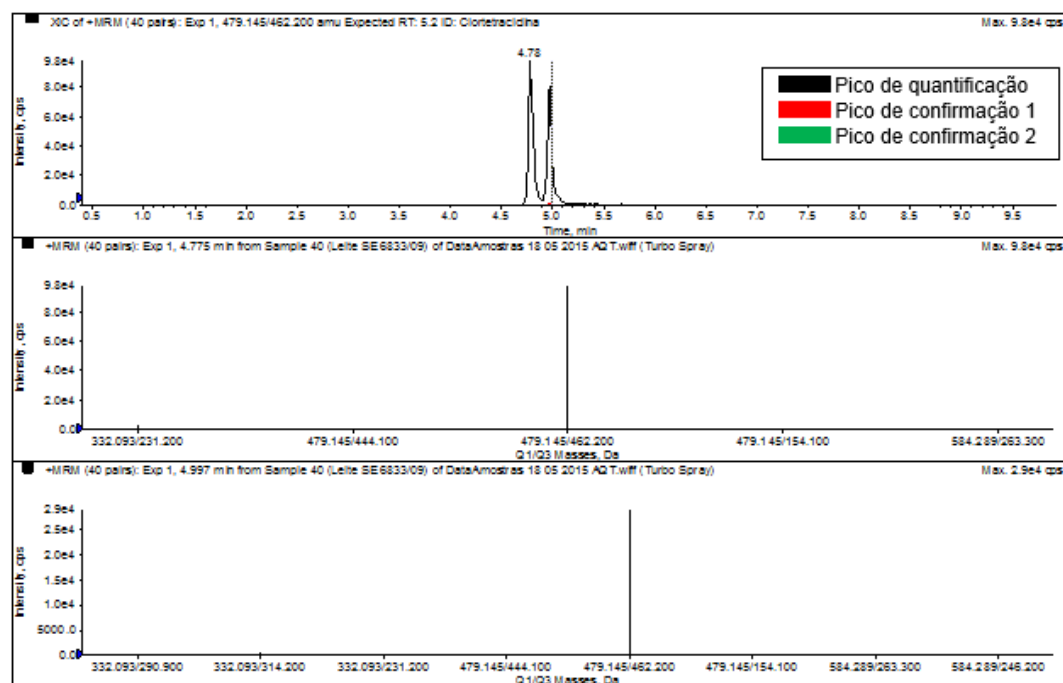


Figura 5 - Amostra de leite em pó integral positiva para Clotetraciclina. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 =$, Pico de confirmação 1 $Q_1/Q_2 =$ e Pico de confirmação 2 $Q_1/Q_2 =$) – conc. 27,29 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.

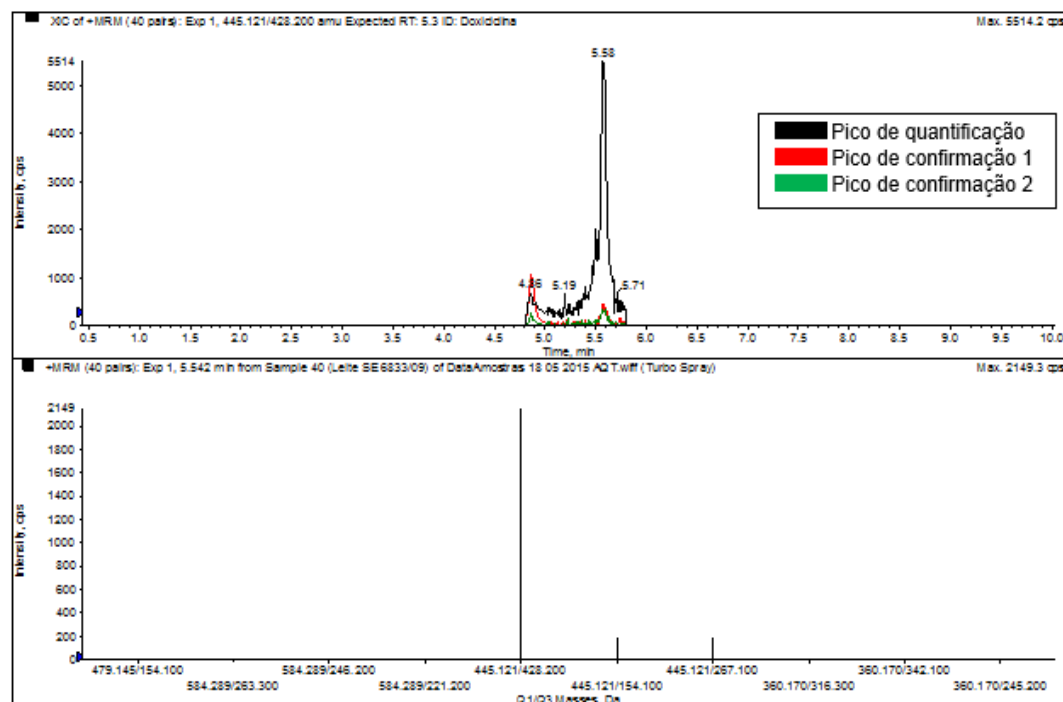


Figura 6 - Amostra de leite em pó integral positiva para Doxiciclina. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 =$ 445,1/428,2, Pico de confirmação 1 $Q_1/Q_2 =$ 445,1/154,1 e Pico de confirmação 2 $Q_1/Q_2 =$ 445,1/267,1) – conc. 42,74 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.

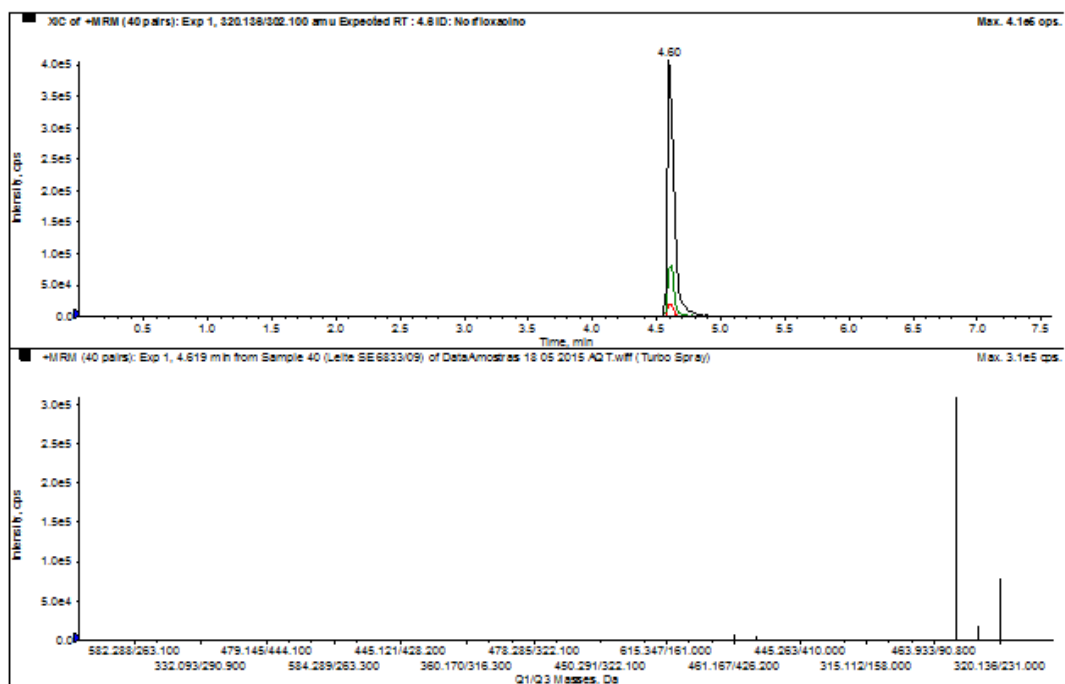


Figura 7 - Amostra de leite em pó integral positiva para Norfloxacin. (Pico de quantificação $Q_1/Q_3 = 320,1/302,1$, Pico de confirmação 1 $Q_1/Q_2 = 320,1/231,0$ e Pico de confirmação 2 $Q_1/Q_2 = 320,1/276,0$) – conc. 45,36 $\mu\text{g/L}$ – Condições analíticas: ver item 2.