

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ANTIBACTERIANOS EM LEITE E FÍGADO BOVINOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE**

MAGDA TARGA MARTINS

Porto Alegre, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE
ANTIBACTERIANOS EM LEITE E FÍGADO BOVINOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE**

Tese apresentada por **Magda Targa Martins** para obtenção do
GRAU DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09 de setembro de 2014 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Flavia Valladão Thiesen
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Martins, Magda Targa

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS EM LEITE E FÍGADO BOVINOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE / Magda Targa Martins. -- 2014. 150 f.

Orientador: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Antibacterianos. 2. LC-MS/MS. 3. Matrizes Alimentares. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman, orient. II. Título.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese de doutorado foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações, para uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- ✓ Introdução: contendo a apresentação do tema;
 - ✓ Objetivo geral e objetivos específicos;
 - ✓ Revisão bibliográfica;
 - ✓ Capítulo I: Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação qualitativa de sulfonamidas, quinolonas, fluorquinolonas, tetraciclina e trimetoprima em leite e fígado bovinos;
 - ✓ Capítulo II: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação quantitativa de quinolonas e fluorquinolonas; sulfonamidas; tetraciclina; bromexina e trimetoprima em leite bovino;
 - ✓ Capítulo III: Desenvolvimento de método analítico para determinação quantitativa de quinolonas, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas em fígado bovino;
 - ✓ Discussão geral;
 - ✓ Conclusão geral;
 - ✓ Referências Bibliográficas.
-

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Elfrides Schapoval pelo exemplo profissional e humano. Agradeço pela orientação e sensibilidade, sempre preocupada com todos.

Aos amigos do Lanagro/RS! Tanara, Cris, Tiago, Jéssica, Louise, Juliana, Fabiano, Rodrigo, Adir, Cláudia, Marcos, Léo, Vinícius, Diana, Dyennifer, Maria, Tânia, Gabriel, Amanda, Ethiene, Tamara, Lenise. Obrigada pela ajuda, alegria e companheirismo. Adoro vocês!

Aos amigos do LEPCQ: Ana Rita, Cássia, Clésio, Diogo, Letícia, Alini, Vitor, Rúbia, Amanda, professor Martin, Leila e Lorena pela amizade de todos esses anos.

Ao Zizo obrigada por toda paciência, beijo!

Às minhas filhas queridas Marina e Gabriela, um beijo enorme. Marina obrigada pela ajuda com as figuras! Gabi, obrigada pelo bom humor!

Ao meu irmão Dido e cunhada Ale pelo incansável plantão, mas muito mais pelas disputas incríveis!

Ao meu irmão Bernardo querido e família, um beijo!

À minha irmã Fafá pelas risadas! Ao Diego um agradecimento “surreal”!

À minha mãe pela disposição de sempre, pelo bom humor e a ajuda nas horas exatas!

À banca examinadora pelas contribuições para o enriquecimento desse trabalho.

A todas as pessoas que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL	29
3.2 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL	30
3.3 DETERMINAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS POR MEIO DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	31
3.3.1 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTIBACTERIANOS POR MEIO DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	33
3.3.2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ANTIBACTERIANOS POR MEIO DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	36
3.4 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS PROPOSTOS	44
3.5 MATRIZES ALIMENTARES	45
3.5.1 LEITE	45
3.5.2 FÍGADO	47
4 CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTIBACTERIANOS EM LEITE E FÍGADO BOVINOS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	49
4.1 INTRODUÇÃO	51
4.2 ARTIGO	51
5 CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE QUINOLONAS, FLUORQUINOLONAS, TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS, TRIMETOPRIMA E BROMEXINA EM LEITE BOVINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	77
5.1 INTRODUÇÃO	79
5.2 ARTIGO	79
6 CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE FLUORQUINOLONAS, TETRACICLINAS E SULFONAMIDAS EM FÍGADO BOVINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	105
6.1 INTRODUÇÃO	107
6.2 ARTIGO	107

7	DISCUSSÃO GERAL.....	129
8	CONCLUSÃO GERAL.....	135
9	REFERÊNCIAS.....	139

LISTA DE FIGURAS

Figure 4.1 Total ion chromatography chromatogram of 24 antibacterials. Milk blank sample (1), blank sample spiked with 24 analytes at CC β level in milk (2), liver blank sample (3) and blank sample spiked with 24 analytes at CC β level in liver(4).....	54
Figure 4.2 Extracted ion chromatogram for liver samples spiked at CC β concentration level for sulfonamides and thrimetoprim.....	55
Figure 4.3 Extracted ion chromatogram for liver samples spiked at CC β concentration level for tetracyclines.....	55
Figure 4.4 Extracted ion chromatogram for liver samples spiked in CC β concentration level for fluoroquinolones.....	56
Figure 4.5 Incurred poultry liver sample with SMZ (A) and incurred milk sample with OTC (B).....	62
Figure 5.1 A, 5.1 B and 5.1 C Total ion chromatography for (A) quinolones and fluoroquinolones, (B) sulfonamides, trimethoprim and bromexine and (C) tetracyclines.....	81
Figure 5.2 Extracted ion chromatogram for milk samples of quinolones and fluoroquinolones at MRM level.....	81
Figure 5.3 Extracted ion chromatogram for milk samples of sulfonamides, thrimetoprim and bromexine at MRL level.....	82
Figure 5.4 Extracted ion chromatogram for milk samples of tetracycles at MRL level.....	83
Figure 6.1 Total ion chromatography (TIC) of antibacterials at MRL level in bovine liver sample.....	103
Figure 6.2 Specificity of liver samples of diferente species (swine, bovine and poultry liver).....	104
Figure 6.3a Extracted ion chromatogram of all selected transitions of quinolones and fluoroquinolones.....	105
Figure 6.3b Extracted ion chromatogram of all selected transitions of sulfonamides.....	106
Figure 6.3c Extracted ion chromatogram of all selected transitions of tetracyclines.....	106
Figure 6.4 Poultry liver samples (A) and (B) contaminated with SQX.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Valores de Limite Máximo de Resíduos Permitido (LMR) (ng.mL ⁻¹) para as matrizes leite e fígado bovinos.....	17
Tabela 3. 1. Métodos qualitativos encontrados na literatura utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial para a determinação de antibacterianos em diferentes matrizes.....	27
Tabela 3.2. Tolerâncias aceitas na razão entre o íon precursor e o íon de confirmação (razão iônica).....	32
Tabela 3.3. Valores de recuperação aceitos para a exatidão do método.....	32
Tabela 3.4. Métodos quantitativos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial referentes à análise de antibacterianos em leite e fígado bovinos descritos na literatura pesquisada.....	35
Tabela 3.5. Substâncias Químicas de Referência utilizadas na validação dos métodos.....	36
Tabela 3.6. Composição do leite.....	38
Table 4.1a. Mass spectrometry and retention times for each analyte (sulfonamides and thrimetoprim).....	50
Table 4.1b. Mass spectrometry and retention times for each analyte (quinolones and fluoroquinolones).....	51
Table 4.1c. Mass spectrometry and retention times for each analyte (tetracyclines).....	51
Table 4.2. Chosen and changed factors for milk and liver samples used in Youden design.....	52
Table 4.3. Maximum residue limits (MRL), detection capability (CC β) values and number of compliant samples in each experiment for each analyte.....	60
Table 5.1. Optimized mass spectrometry values for each analyte.....	76
Table 5.2. Matrix effect and recovery obtained for each analyte.....	80
Table 5.3. Linear regression and linearity of all analytes.....	85
Table 5.4. Precision and accuracy of the proposed methods for all analytes..	86
Table 5.5. Detection Limit, Quantitation Limit, Decision Limit, Detection Capability and Maximum Residue Limit for each analyte.....	87
Table 6.1. Mass spectrometry parameters and retention times for each analyte.....	100
Table 6.2. Recovery of the proposed extraction procedure and matrix effect for antibacterials.....	102
Table 6.3. Coefficients of determination (R ²) and ANOVA from three different calibration curves of antibacterials.....	108
Table 6.4. Precision and accuracy for antibacterials in bovine liver.....	109
Table 6.5. Maximun Residue Limits (MRLs), Decision limit (CC α) and Detection capability (CC β) for each antibacterial used in the presente study..	110

RESUMO

A presença de resíduos de medicamentos antibacterianos em alimentos é um importante problema de saúde pública. Estas substâncias podem estar presentes nos alimentos como resultado das práticas produtivas. A exposição contínua a resíduos desses medicamentos pode ocasionar tanto reações de hipersensibilidade nos indivíduos suscetíveis, bem como colaborar com a resistência de microrganismos patogênicos. Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos capazes de determinar diferentes substâncias em matrizes complexas como os alimentos. A técnica analítica mais utilizada para esse fim é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série com ionização por eletronebulização e analisador de massas triplo quadrupolo (QqQMS). Por meio dessa ferramenta analítica é possível determinar diferentes substâncias de forma inequívoca com sensibilidade e seletividade adequadas. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método analítico de triagem para determinação qualitativa multirresíduo/multiclasse de antibacterianos em alimentos como leite e fígado bovinos. As classes das tetraciclinas (TCs), sulfonamidas (SAs), quinolonas (Qs), fluorquinolonas (FQs) e trimetoprima foram abordadas nos métodos de triagem e, posteriormente, por meio de um método confirmatório exclusivo para cada classe de antibacteriano. Os valores de Capacidade de Detecção ($CC\beta$) obtidos situaram-se entre 0,10 e 0,50 vezes o Limite Máximo de resíduos permitido (LMR) para os diferentes analitos no leite e $0,50 \times$ LMR para os analitos em fígado bovino. Os métodos quantitativos foram validados de acordo com a diretiva da União Europeia 2002/657/CE avaliando os seguintes parâmetros: interferência de matriz, linearidade, precisão, exatidão, especificidade, seletividade, estabilidade de padrões, limites de detecção e de quantificação, além dos parâmetros de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$). Os métodos validados apresentaram-se dentro dos valores aceitáveis e todos os métodos desenvolvidos têm a característica de serem facilmente executáveis.

Palavras-chaves: LC-MS/MS, multirresíduo, tetraciclinas, sulfonamidas, fluorquinolonas.

ABSTRACT

The presence of residues of antibacterial drugs in foods is an important public health problem. These substances may be present in food as a result of productive practices. Continuous exposure to residues of these drugs can cause both hypersensitivity reactions in susceptible individuals, as well as collaborate with the resistance of pathogenic microorganisms. In this way, it is extremely important to the development of methods capable of determining different substances in complex matrices as foods. The analytical technique used for this purpose is the liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem and triple quadrupole analyzer (QqQMS). Through this analytical tool it is possible to determine different substances unequivocally with appropriate sensitivity and selectivity. The purpose of this study was to develop and validate an analytical method for screening of multiresidue/multiclass of antibacterial in foods such as milk and liver. The classes of tetracyclines (TCs), sulfonamides (SAs), quinolones (Qs), fluoroquinolones (FQ) were addressed in qualitative methods and, later, through a confirmatory method unique to each class of antibacterial. The values of detection capability ($CC\beta$) obtained were between 0.10 and 0.50 times the allowed maximum residue limit (MRL) for different analytes in milk and 0.50 times the allowed MRL for the analytes in bovine liver. The quantitative methods were validated in accordance with European Commission 2002/657/EC, evaluating the following parameters: matrix effect, specificity, selectivity, linearity, precision, accuracy, stability of standards, limits of detection and quantitation. In addition, the parameters of decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) were also determined. Validated methods were within the acceptable values and all the methods developed have the characteristic of being easily executable.

Keywords: LC-MS/MS, multiresidue, tetracyclines, sulfonamides, fluoroquinolones.

O cenário mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à segurança do produto a ser consumido. Recentes acontecimentos envolvendo adulteração e contaminação de produtos de origem animal têm despertado a atenção do consumidor e evidenciado a necessidade de normas mais rígidas que garantam o consumo de alimentos seguros por parte da população (PASCHOAL *et al.*, 2008). Resíduos de antibacterianos em alimentos são motivo de preocupação em termos de saúde pública (657/CE/2002), porém dados epidemiológicos sobre seus reais efeitos adversos ainda são escassos. Os alimentos são um importante veículo para o desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009).

A possibilidade da presença desses resíduos no alimento representa um risco potencial à saúde do consumidor, pois além do possível efeito toxicológico direto, podem ocasionar reações alérgicas nos consumidores sensíveis e, pequenas concentrações destes fármacos, podem induzir à seleção de bactérias patogênicas resistentes (CORPET, 1996). Fármacos como as tetraciclinas, sulfonamidas e quinolonas são amplamente utilizados em aplicações veterinárias. Outro dado importante é que quando se fala de contaminantes em alimentos, faz-se referência a uma grande variedade de substâncias que podem remanescer no produto final na forma original ou, ainda, como subprodutos ou metabólitos, quando degradados ou biotransformados (LEE *et al.*, 2007; PASCHOAL *et al.*, 2008).

O uso de antibacterianos em medicina veterinária é feito com finalidade mais ampla do que as tradicionalmente utilizadas em seres humanos. Além do uso terapêutico e profilático, o médico veterinário emprega os antibacterianos na metafilaxia (quando alguns animais do rebanho estão com uma determinada doença, ou seja animais em risco ou tratamento de animais em contato) e como aditivo zootécnico melhorador do desempenho (SPINOSA *et al.*, 2011). As classes de substâncias avaliadas no presente trabalho foram as tetraciclinas, sulfonamidas quinolonas e fluoroquinolonas pelo seu amplo uso em medicina veterinária. Esses medicamentos apresentam amplo espectro de atividade e são vantajosos financeiramente. O antibacteriano trimetoprima foi escolhido pela sua importância nas associações com as sulfonamidas, agindo em uma rota diferente das sulfonamidas. A bromexina foi selecionada por ser um fármaco utilizado

concomitantemente com antibacterianos em infecções respiratórias e apresentar características compatíveis com os demais fármacos para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS).

Os animais de produção tratados com antibacterianos devem receber atenção especial, visando impedir que os resíduos presentes nos produtos de origem animal venham a atingir a espécie humana, causando dano a sua saúde. Deve-se, portanto, obedecer o período de carência que corresponde ao tempo necessário para que o resíduo de preocupação toxicológica atinja concentrações seguras. A correta observância do período de carência evita que se atinja o limite máximo de resíduo (LMR). Este, por sua vez, é fixado pelo *Codex Alimentarius* (órgão ligado à Organização Mundial de Saúde-OMS). O LMR específico é estabelecido e definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento e é baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana, considerando-se a IDA (Ingestão Diária Aceitável) do composto. Na Tabela 1.1 estão descritos os LMRs das substâncias abordadas neste trabalho para leite e fígado bovinos, respectivamente. O Brasil apresenta um Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) que visa à proteção do consumidor, tanto pela exposição prolongada a esses resíduos, como pela grande quantidade de leite e carnes que são consumidas em todo o mundo (MAURICIO *et al.*, 2009).

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. O crescimento do uso de técnicas mais seletivas como o LC-MS/MS tornou possível o desenvolvimento de métodos multirresíduo, contemplando diferentes contaminantes, tanto para os métodos qualitativos de triagem como para os métodos confirmatórios. Por meio dos métodos de triagem, pode-se suspeitar de amostras não-conformes, as quais devem ser posteriormente confirmadas e quantificadas. Parâmetros de validação para ambas as abordagens são exigidos (657/CE/2002).

Tabela 1. 1. Valores de Limite Máximo de Resíduos (LMR) (ng.mL⁻¹) para a matriz leite e (ng.g⁻¹) para a matriz fígado bovino.

Fármaco	Leite Bovino			Fígado bovino		
	Brasil ^a	Codex ^b	UE ^c	Brasil ^a	Codex ^b	UE ^c
Sulfadimetoxina*	100	---	100	100	---	100
Sulfaquinoxalina*	100	---	100	100	---	100
Sulfadiazina*	100	---	100	100	---	100
Sulfatiazol*	100	---	100	100	---	100
Sulfametoxazol*	100	---	100	100	---	100
Sulfametazina*	100	---	100	100	---	100
Sulfaclorpiridazina*	100	---	100	100	---	100
Sulfizoxazol*	100	---	100	100	---	100
Sulfadoxina*	100	---	100	100	---	100
Sulfamerazina*	100	---	100	100	---	100
Clortetraciclina	100	100	100	100	600	300
Doxiciclina	---	---	---	---	---	300
Tetraciclina	100	100	100	---	600	100
Oxitetraciclina	100	100	100	---	600	300
Ácido Oxolínico	---	---	150	---	---	---
Ácido Nalidíxico	---	---	---	---	---	---
Flumequina	50	---	50	---	400	500
Difloxacino	---	---	---	---	---	1400
Ciprofloxacino	100	---	100	---	---	300
Enrofloxacino	100	---	100	---	---	300
Norfloxacino	---	---	---	---	---	---
Sarafloxacino	---	---	---	---	---	---
Danofloxacino	30	---	30	---	400	400
Trimetoprima	---	---	50	---	---	50
Bromexina	---	---	---	---	---	---

* O resíduo total de todas as substâncias do grupo das sulfonamidas não deve exceder 100 ng g⁻¹.

(a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 24/2011 (09/08/2011).

(b) <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>

(c) For veterinary drugs: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf

As ferramentas analíticas devem ser adequadas para o desenvolvimento de métodos capazes de detectar pequenas quantidades de medicamentos em alimentos. A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo a um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molecular e aumento adicional da seletividade). A utilização do modo SRM “monitoramento de reações selecionadas” possibilita a análise de fragmentos de vários íons produto provenientes de um ou mais íons precursores (CHIARADIA, 2008; LOPES *et al.*, 2012).

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa de antibacterianos em leite e fígado bovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar métodos analíticos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série para a determinação qualitativa de tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas e fluoroquinolonas, trimetoprima em leite e fígado bovinos;
- Desenvolver e validar métodos analíticos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série para a determinação quantitativa de tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas e fluorquinolonas, trimetoprima e bromexina em leite bovino;
- Desenvolver e validar método analítico baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série para a determinação quantitativa de tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas e fluorquinolonas em fígado bovino.

3.1 Resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal

O cenário mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido (PASCHOAL *et al.*, 2008). Na agricultura moderna, medicamentos veterinários são utilizados em larga escala para a prevenção e tratamento de doenças. Entre as várias substâncias de importância na análise de alimentos estão os agrotóxicos e antibacterianos, adicionados não intencionalmente, mas presentes na forma de resíduos como resultados do processo produtivo. Mais de 40.000 tipos de antibacterianos foram descobertos, sendo que 80 desses são utilizados na agroindústria (KREUZIG *et al.*, 1996).

Antibacterianos são substâncias capazes de causar a morte ou inibir o crescimento de microrganismos sem comprometer a saúde do indivíduo medicado. São empregados em medicina veterinária como medicação terapêutica, metafílica, profilática, de grande importância no tratamento e prevenção de doenças infecciosas e como aditivos de rações ou zootécnicos, visando diminuir a mortalidade e melhorar o desempenho de animais de produção. Stokstad e Jukes relataram, em 1950, que a adição de estreptomicina e clortetraciclina, na presença de quantidade suficiente de vitamina B 12 foi capaz de estimular o crescimento de animais. O uso dessas substâncias têm despertado enorme polêmica junto à sociedade pela possibilidade de remanescerem resíduos nos produtos derivados dos animais tratados e por aspectos ligados ao desenvolvimento de resistência bacteriana (SPINOSA *et al.*, 2011).

A administração irresponsável de medicamentos em animais utilizados para a produção de alimentos pode resultar na presença de resíduos em carnes, leite e seus derivados. Os antibacterianos são largamente utilizados para o tratamento de mastites em gado leiteiro, mas também de outras infecções como pneumonia, diarréia bacteriana, artrite bacteriana (GOTO *et al.*, 2005). Teoricamente os diversos usos de antibacterianos no manejo do gado, podem resultar na presença de resíduos no leite e na carne. Isto ocorre particularmente se não forem usados de acordo com as indicações de bula. Conceitualmente, o chamado resíduo de

medicamento veterinário inclui: fração do fármaco, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem nos tecidos dos animais tratados, sendo expressos em mg kg^{-1} ou m gL^{-1} (ppm), ou ainda por $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou μgL^{-1} (ppb). Nos últimos anos, a ocorrência de resíduos de antibacterianos em leite tem sido um dos grandes desafios impostos à indústria dos alimentos, pelo fato de interferirem na manutenção de alguns produtos lácteos, causarem hipersensibilidade em humanos e aumentarem a resistência aos tratamentos com esses fármacos. Desta forma, os riscos à saúde impostos pela presença desses resíduos nos alimentos podem ser classificados em três categorias:

- Farmacológicos e toxicológicos;
- Microbiológicos (desenvolvimento de resistência de microrganismos patogênicos na flora intestinal);
- Riscos imunopatológicos, como alergias (SANTOS e FONSECA, 2007).

3.2 Análise de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal

As análises de controle de qualidade de alimentos são realizadas para garantir a qualidade e segurança dos produtos, enquanto as análises de fiscalização de alimentos são desenvolvidas com o objetivo de verificar o cumprimento da legislação relacionada à presença de substâncias químicas em alimentos. A análise de amostras deve ser efetuada exclusivamente por laboratórios aprovados pela autoridade nacional. Existem substâncias as quais a utilização não é permitida ou não existem limites estabelecidos e, para tanto, limites mínimos de desempenho requerido (LMDR) devem ser previstos (657/CE/2002). As amostras devem ser manipuladas de forma a evitar contaminações acidentais ou perda das substâncias a analisar. A União Europeia estabeleceu limites máximos de resíduos (LMRs) em diferentes produtos de origem animal. Muitos trabalhos têm sido publicados nessa área. Somente entre 1998 e 2005 mais de 400 artigos sobre resíduos de medicamentos veterinários foram publicados (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009).

Para monitorar os resíduos de antibacterianos em leite, são comumente utilizados testes de triagem imunológicos e de inibição microbiológica. Essas

técnicas de bioensaio foram amplamente utilizadas em métodos de triagem pela sua simplicidade, porém necessitam ser complementadas por métodos químicos mais sensíveis e seletivos (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009). Algumas desvantagens desses testes são: baixa especificidade na determinação do fármaco, níveis de detecção limitados, longo tempo de análise para alguns testes, além de casos falso-positivos devido à presença de altas contagens de células somáticas e substâncias inibitórias encontradas em alimentos de origem animal, tais como lisozima e lactoferrina (NERO *et al.*, 2007).

Desde 1970, métodos para a detecção de resíduos de antibacterianos em leite são utilizados e vários testes foram criados com o objetivo de detectar rapidamente a presença desses resíduos. Alguns exemplos são: Delvotest P™; Penzime™; BsDA-disk™ assay; Cite Probe-lactam™; LacTec™; Charm Farm Test™. Primeiramente, testes de inibição de culturas de bactérias eram utilizados (Devotest). Recentemente, kits mais rápidos para a detecção de antibacterianos baseados em imuno receptores estão disponíveis (Twin-Sensor, Charm II, β -star) (ORTELLI *et al.*, 2009). Um trabalho publicado por Kloth e colaboradores (2009) apresenta um método de imunoensaio baseado em quimiluminescência para a determinação de 13 diferentes antibacterianos em leite. Alguns destes encontram-se disponíveis no comércio brasileiro, outros são importados. Cada um apresenta vantagens e desvantagens. O número de falso-positivos pode variar entre 0,6 a 19,7%, segundo estudos realizados em diversos países. Pesquisas, inclusive brasileiras, têm desenvolvido métodos para eliminar os falso-positivos. Porém, alternativas como a utilização da espectrometria de massas, com a possibilidade de inclusão de diversos analitos tem se tornado uma opção atrativa (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

3.3 Determinação de antibacterianos por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série

O emprego de métodos analíticos sensíveis é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a eficácia e a segurança do uso de um medicamento. A escolha do método a ser utilizado na análise depende de vários fatores, tais como a natureza do fármaco, pureza e quantidade de amostra. Além disso, deve-se levar em conta as condições do laboratório e os custos envolvidos na

análise (AVEDAÑO, 1993). Agências de saúde em vários países dependem de detecções por espectrometria de massas por ser um detector específico e capaz de confirmações inequívocas de contaminantes em gêneros alimentícios. A diretiva 657/2002 da Comunidade Europeia decide que métodos baseados somente por cromatografia não são sensíveis como métodos confirmatórios (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009). Desde a década passada, a LC-MS/MS se tornou uma técnica essencial em laboratórios de análises de alimentos (BLASCO *et al.*, 2009). Atualmente, mais de 90% dos métodos analíticos para a análise de resíduos em alimentos são baseados em LC-MS/MS, sendo que a cromatografia líquida, na maioria das vezes, é de fase reversa e utiliza-se um gradiente de fase móvel (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009). O uso de fase móvel aquosa acidificada é bastante comum em análise de antibacterianos por espectrometria de massas, pois melhora a eficiência da ionização (GROS *et al.*, 2013). Os analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo têm se tornado a técnica de escolha no âmbito de análise de resíduos em alimentos. A fonte de ionização mais aplicada nesses casos é fonte de ionização por eletronebulização (ESI) pela alta polaridade dessas substâncias. A desvantagem dessa forma de ionização é a possível supressão de sinal (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009).

Para a análise qualitativa e quantitativa de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal deve-se utilizar métodos validados (657/CE/2002). A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida. Os estudos para validação dos métodos analíticos devem ser realizados de acordo com os principais códigos oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, quando aplicáveis, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005a). Para os métodos utilizados para a determinação de resíduos de medicamentos em alimentos utiliza-se os parâmetros de Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$). Essas definições são utilizadas pela União Europeia e indicam o menor nível no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de 95% que o analito está presente ($CC\alpha$) e a menor quantidade que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma

amostra por um determinado método com uma probabilidade de erro aceitável (CC β) (657/CE/2002; PASCHOAL *et al.*, 2008). Esses parâmetros são importantes pois levam em consideração a variabilidade inerente do método validado. Segundo a diretiva da Comunidade Europeia (657/CE/2002) são estabelecidos critérios de desempenho e procedimentos para a validação de métodos qualitativos, quantitativos e de confirmação separadamente.

3.3.1 Determinação qualitativa de antibacterianos por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série

Os métodos de triagem qualitativos são utilizados para processar um número elevado de amostras com o objetivo de evitar resultados falso-negativos. Devem ser capazes de detectar uma substância ou classe de substâncias ao nível requerido (657/CE/2002). Para efeitos de triagem pode-se utilizar as técnicas analíticas validadas que possuam uma taxa de resultados falso-negativos inferiores a 5% (erro β ao nível requerido). Recentemente, novas tendências usando as vantagens da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS) ou espectrometria por tempo de voo (TOF-MS) têm sido desenvolvidas para triagem de medicamentos de diferentes classes. Essas ferramentas permitem analisar um grande número de medicamentos veterinários simultaneamente (KAUFMANN *et al.*, 2008; STOLKER *et al.*, 2007; WILLIAMSON e BARLETT, 2007; STOLKER *et al.*, 2008). Quando há suspeita de resultado positivo, este deve ser analisado novamente por meio de um método quantitativo e confirmatório (657/CE/2002).

Os critérios de desempenho analítico para métodos de triagem incluem: especificidade e seletividade, limite de detecção (LD), (CC β), aplicabilidade, robustez e estabilidade. É importante esclarecer que o LD é a menor concentração que se pode detectar um analito por meio de um determinado método e o valor de CC β é a menor concentração que se pode detectar um analito com erro estatístico \leq 5%. Para tanto, a determinação prática do valor de CC β é realizada pela fortificação de 21 replicatas em concentrações abaixo do LMR estabelecido para a(s) substâncias. A concentração na qual se obtiver, no máximo, um resultado negativo será o valor de CC β . Esse experimento conduz a um método eficiente e capaz de fornecer uma probabilidade de resultados falso-negativos de 5%. Um método de triagem é definido como o primeiro processo aplicado com o objetivo de detectar a

presença ou não de uma substância (AERTS *et al.*, 1995; ORTELLI *et al.*, 2009; STEAD *et al.*, 2011; LEHOTAY *et al.*, 2013).

Foram encontrados na literatura trabalhos referentes à análise de antibacterianos em diferentes matrizes por meio de LC-MS/MS com abordagem qualitativa, alguns dos quais estão descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1. Métodos qualitativos encontrados na literatura utilizando LC-MS/MS para a determinação de antibacterianos em diferentes matrizes.

Referência	Fármacos	Extração	Matriz
Granelli e Branzell (2007)	Tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas, β -lactâmicos e macrolídeos	EDTA 0,1M e metanol 70%	Músculo e Rim
Turnipseed <i>et al.</i> (2008)	Sulfonamidas, tetraciclina, β -lactâmicos, fluorquinolonas e macrolídeos	Acetonitrila, EFS*, filtração	Leite
Gaugain-Juhel <i>et al.</i> (2009)	58 antimicrobianos (sulfonamidas, penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, aminoglicosídeos e lincomicina)	Dois processos extrativos para diferentes classes 1-Acetonitrila, centrifugação, evaporação, diluição com acetato de amônio e filtração; 2- ácido tricloroacético (TCA) 5%, centrifugação e filtração	Leite
Ortelli <i>et al.</i> (2009)	150 fármacos veterinários (fluorquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, β -lactâmicos, bromexina)	Acetonitrila, ultrafiltração, evaporação	Leite
Vidal <i>et al.</i> (2010)	Doxiciclina, enrofloxacino, danofloxacino, difloxacino, sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfaclopiridazina	Acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético, EDTA, sulfato de magnésio anidro, acetato de sódio, centrifugação e filtração	Leite
Bittencourt <i>et al.</i> (2012)	Tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluorquinolonas	Metanol, acetonitrila acidificados, EDTA, utilização de areia purificada e tratada com EDTA	Músculo
Martins <i>et al.</i> (2014)	Tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e fluorquinolonas	Dois processos extrativos diferentes para cada matriz utilizando etanol acidificado e EDTA para o leite e metanol, acetonitrila e EDTA para o fígado.	Leite e Fígado bovinos

*Extração em fase sólida.

O interesse em propor métodos qualitativos utilizando técnicas de LC-MS/MS se baseia na eliminação de resultados falso-positivos ou falso-negativos que ocorrem comumente em testes rápidos de triagem. Além disso, um kit de teste rápido de triagem é necessário para cada classe de antibacterianos, o que torna a abordagem desfavorável financeiramente (ORTELLI *et al.*, 2009). A baixa sensibilidade desses testes é outro fator que corrobora a importância do desenvolvimento de análises de confiáveis.

3.3.2 Determinação quantitativa de antibacterianos por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série

Os métodos de confirmação para resíduos e contaminantes devem fornecer informações completas para a identificação inequívoca de uma substância e, caso necessário, sua quantificação ao nível requerido. Os métodos quantitativos são capazes de determinar a fração mássica de uma substância, podendo esta ser expressa por meio de um valor numérico com as unidades apropriadas. Para tanto, métodos que utilizam apenas a análise cromatográfica, sem recurso de detecção por espectrometria, não são adequados enquanto métodos de confirmação. Um método baseado em espectrometria de massas é adequado para confirmação apenas se usado após uma separação prévia por cromatografia (657/CE/2002). As técnicas de espectrometria de massas em série (MS/MS) devem ser baseadas em monitoramento de reações selecionadas. Para as análises quantitativas, analisadores de massas do tipo triplo quadrupolo são preferidos por apresentarem maior seletividade do que os analisadores por tempo de voo (TOF-MS) (ORTELLI *et al.*, 2009).

Os estudos para validação dos métodos analíticos devem ser realizados de acordo com os principais Códigos Oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico: recuperação, efeito matriz, seletividade, especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, $CC\alpha$, $CC\beta$, robustez e aplicabilidade (BRASIL, 2003; 657/CE/2002). Como pode ser notado, existem alguns parâmetros a serem avaliados que são específicos no que diz respeito à análise de resíduos em alimentos. Além disso, alguns fatores como a utilização de padronização interna, bem como a análise do efeito que a matriz provoca na resposta do analito são

primordiais para o desenvolvimento de um método satisfatório (BRONSEMA *et al.*, 2012).

Quando se emprega espectrometria de massas, o uso de padronização interna é bastante comum. Além das variabilidades com relação ao detector, existem efeitos relacionados à intensidade do sinal devido à supressão iônica, principalmente com relação às técnicas de ionização mais utilizadas como a eletronebulização, causada por co-eluição de componentes da matriz que influenciam na formação do íon (CHAMBERS *et al.*, 2007; JEMAL *et al.*, 2010; BRONSEMA *et al.*, 2012). A escolha de um padrão interno deve ser baseada em compostos que apresentem uma relação estrutural com o(s) analito(s), ou seja, propriedades físicas e químicas semelhantes aos analitos de interesse. O padrão interno (PI) não pode estar presente na amostra, mas suas propriedades físico-químicas devem ser tão semelhantes quanto possível da(s) substância(s) a analisar e, ao mesmo tempo, deve gerar uma resposta que possa ser diferenciada do(s) analito(s) em questão. O padrão interno deve ser adicionado em quantidades iguais a cada amostra a analisar, bem como a cada amostra controle (657/CE/2002). Devido à semelhança do padrão interno com o analito, a relação entre os mesmos não se modifica, pois ambos apresentam a mesma perda no processo de extração, digestão ou ionização. Desta forma, o (PI) corrige a resposta causada pela variabilidade do procedimento analítico (BRONSEMA *et al.*, 2012).

O preparo de amostra é o processo pelo qual os resíduos químicos são retirados da matriz, removendo interferentes e, se necessário, concentrando o extrato. Desta forma, no âmbito da análise de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal o preparo da amostra é crítico. Para métodos que envolvem um grande número de analitos, a opção é a utilização de métodos extrativos não seletivos para abranger compostos com propriedades físico-químicas distintas. Com a utilização de métodos de extração mais genéricos, o extrato final pode conter uma quantidade significativa de componentes da matriz que podem interferir na detecção e na seletividade do método (BERENDSEN *et al.*, 2013). Para a análise de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, a acetonitrila é a mais reportada como solvente de extração (MOL *et al.*, 2008). A acetonitrila apresenta vantagens interessantes, possibilitando a extração de

componentes de diferentes polaridades e possibilita a extração de um menor número de co-extrativos, como gorduras e pigmentos que podem estar presentes na matriz. Além disso, quando acidificada, a acetonitrila pode proporcionar um aumento na recuperação de alguns analitos e é o solvente mais adequado para utilização em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (MASTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

O efeito matriz deve ser determinado e pode contribuir na alta variabilidade da exatidão, fazendo com que seja mais difícil quantificar amostras positivas. Um aumento importante na exatidão do método indica um aumento de sinal obtido por componentes da matriz e deve ser controlado para evitar erros (ORTELLI *et al.*, 2009). A avaliação do efeito matriz se torna importante nos métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas devido à possibilidade de ocorrer supressão da ionização e, conseqüentemente, diminuição da resposta obtida. O efeito matriz pode ser originado pela competição entre o analito e os interferentes que co-eluem com o mesmo. Dependendo das condições de ionização e evaporação, esta competição pode levar a um decréscimo de sinal (supressão iônica) ou um aumento do sinal. Se o efeito matriz calculado for superior a 100%, tem-se um aumento de sinal pela presença dos componentes da matriz. Se o efeito matriz for inferior a 100%, tem-se uma supressão de sinal, o que é considerado uma desvantagem (GOSETTI *et al.*, 2010). Para avaliar esse parâmetro, deve-se utilizar uma solução padrão com os analitos investigados, uma amostra fortificada com os analitos investigados e uma amostra fortificada com os analitos investigados após o processo de extração, todas no mesmo nível. Os valores em área obtidos são submetidos aos seguintes cálculos:

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{TS}{S} \times 100$$

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{R}{TS} \times 100$$

Onde,
TS = *Tissue Standard*, matriz fortificada após o processo de extração;
S = Solução dos analitos em solvente;
R = Amostra contendo todos os analitos.

A presença de compostos endógenos em pequenas gotículas da solução nebulizada pode resultar em aumento de sinal dos analitos comparado a uma solução de referência. O uso da curva padrão feita em matriz supera os efeitos de matriz e é o método mais utilizado na maioria dos trabalhos que abrangem análise de resíduos (BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009).

A recuperação aceitável dos antibacterianos obtida pelo processo de extração deve estar entre 70 e 120% quando se está trabalhando com concentrações entre 10 e 100 ng.g⁻¹ e entre 60 e 130% quando a concentração trabalhada é inferior a 10 ng.g⁻¹ (657/CE/2002).

A seletividade de um método é avaliada com a finalidade de verificar as possíveis interferências que podem ocorrer no método pelas características inerentes da amostra. Para tanto deve-se analisar um número adequado de amostras em branco representativas ($n \geq 20$) e verificar as possíveis interferências na zona em que se prevê a eluição da substância a analisar. Deve-se verificar se a presença de interferentes pode conduzir a uma falsa identificação ou influenciar apreciavelmente na quantificação (657/CE/2002).

A especificidade de um método é a capacidade do mesmo em distinguir a substância a analisar de outras substâncias, dependendo essencialmente da técnica utilizada. A espectrometria de massas é uma técnica bastante específica, principalmente ao trabalhar no modo de “Monitoramento de Reações Seleccionadas” (SRM). A presença de duas transições em combinação com o tempo de retenção esperado garante a identificação inequívoca do analito (657/CE/2002; BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009; GAUGAIN-JUHEL *et al.*, 2009). Para cada analito, deve-se verificar a razão entre o íon precursor e o íon de confirmação. Essa razão iônica deve ser identificada por meio do espectro ou pela integração dos sinais. O íon produto deve ter uma intensidade $\geq 10\%$ do íon precursor. A relação entre os mesmos deve permanecer e as tolerâncias estão demonstradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Tolerâncias aceitas na razão entre o íon precursor e o íon de confirmação (razão iônica).

% em relação ao íon precursor	Tolerância
>50%	± 20%
20% - 50%	± 25%
10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

*Fonte: 657/CE/2002.

A linearidade de um método representa a relação existente entre a variação da concentração e a resposta analítica. A União Europeia recomenda o emprego de, pelo menos, 5 pontos na construção da curva analítica. Os resultados obtidos devem ser avaliados estatisticamente.

A precisão de um método é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes calculados sob a forma de desvio padrão relativo (DPR%) ou coeficiente de variação (CV%). A repetibilidade é o resultado de ensaios independentes do mesmo método, com o mesmo material de ensaio, no mesmo laboratório, realizado pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento num mesmo dia. A precisão intradia (repetibilidade), relaciona os resultados de diferentes replicatas obtidos em um mesmo dia de análise. A precisão interdía (precisão intermediária) relaciona os resultados obtidos em dias diferentes. A reprodutibilidade é o resultado de ensaios independentes do mesmo método, com o mesmo material de ensaio, mas em equipamentos diferentes, operadores diferentes, laboratórios diferentes (657/CE/2002).

A exatidão de um método é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência. Quando não existe Material de Referência Certificado (MRC) disponível, que consiste em um material com um conteúdo específico de substância a analisar, a recuperação deve ser determinada por meio da matriz branca fortificada. Na Tabela 3.3 estão demonstrados os valores aceitos para a exatidão do método.

Tabela 3.3. Valores de recuperação aceitos para a exatidão do método.

Fração mássica	Intervalo
≤ 1 µg/kg	-50% a +20%
> 1 µg/kg a 10 µg/Kg	-30% a +10%
≤ 10 µg/kg	-20% a +10%

*Fonte: 657/CE/2002.

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de analito que pode ser diferenciada do zero. Para métodos envolvendo cromatografia o valor obtido deve apresentar uma relação entre o sinal e o ruído superior a 3 (PASCHOAL *et al.*, 2008).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas. Para métodos envolvendo cromatografia o valor obtido deve apresentar uma relação entre o sinal e o ruído superior a 10. Para que o método seja aceitável, o limite de quantificação deve ser menor que o LMR do analito (PASCHOAL *et al.*, 2008).

O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) são dois limites estatísticos que servem para avaliar as concentrações críticas acima das quais o método diferencia e quantifica com segurança uma substância levando em conta a variabilidade do método e o risco estatístico de ter uma decisão errada. O $CC\alpha$ é o limite acima do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α (probabilidade de uma amostra ser conforme apesar de ter tido um resultado não conforme (falso +)) (ORTELLI *et al.*, 2009). Para substâncias com LMR definidos, $CC\alpha$ é a concentração acima da qual se pode concluir com uma probabilidade de erro α que uma amostra é positiva. Este parâmetro pode ser determinado das seguintes formas descritas a seguir. Por meio da curva padrão, usando-se material em branco fortificado em redor do limite permitido, em pontos equidistantes ao LMR, analisando os resultados em função da concentração adicionada, tendo como $CC\alpha$ o valor do LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. Ou analisando, pelo menos, 20 amostras brancas fortificadas no LMR. O $CC\alpha$ é igual à concentração do limite permitido mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. O $CC\beta$ é definido como a menor quantidade de substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada numa amostra com uma probabilidade de erro β . Em $\beta\%$ dos casos uma amostra positiva vai ser classificada como negativa e revela um resultado falso negativo. Este parâmetro pode ser determinado das seguintes formas descritas a seguir. Por meio da curva padrão, usando-se material em branco fortificado em redor do limite permitido, em pontos equidistantes ao LMR, analisando os resultados em função da concentração adicionada, tendo como $CC\beta$ o valor do

CC α mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. Ou analisando, pelo menos, 20 amostras brancas fortificadas no LMR. O CC β é igual à concentração do CC α mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. (657/CE/2002; BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009).

A robustez de um método corresponde à suscetibilidade do mesmo a alterações das condições experimentais, seja por mudanças no pH, alterações no armazenamento de soluções, lote de reagentes e colunas (657/CE/2002), bem como a realização do método por analistas diferentes. A possibilidade da utilização de diferentes equipamentos também gera um dado importante de robustez para análises de rotina, podendo contar com a intercambialidade de máquinas em situações de manutenção ou problemas.

A aplicabilidade do método tem por objetivo a verificação do real desempenho do método proposto em amostras além das utilizadas na validação. A análise de diferentes materiais provenientes de vários produtores possibilita a visualização da *performance* geral do método. Além disso, em um número elevado de análises por meio do método proposto, podem ser feitos ajustes, caso necessário. Esses estudos utilizam a introdução deliberada pelo laboratório de pequenas variações razoáveis e a observação de suas consequências. Desta forma, na diretiva 657 da União Europeia a aplicabilidade está descrita juntamente com a robustez do método (657/CE/2002). Para tanto, a aplicabilidade deve ser avaliada em amostras reais, contaminadas ou não. Por meio da experimentação é possível avaliar o real valor do método. As técnicas desenvolvidas devem ser atrativas e úteis para análises de rotina (STTUBINGS e BIGWOOD, 2009).

Os métodos quantitativos encontrados na literatura pesquisada para a matriz leite e fígado bovinos com relação aos fármacos abordados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Métodos quantitativos baseados em CL-EM/EM referentes à análise de antibacterianos em leite e fígado bovinos descritos na literatura pesquisada.

Referência	Matriz	Fármacos	Extração
Goto <i>et al.</i> , 2005	Músculo, fígado, rim (bovino); Músculo, fígado, rim (suíno)	Tetraciclina e penicilinas	Água destilada e ultrafiltração
Koesukiwat <i>et al.</i> 2007	Leite	Sulfonamidas e tetraciclina	TCA/Tampão McIlvaine
Martins-Junior <i>et al.</i> 2007	Leite	B-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas e eritromicina	Acetonitrila, cloreto de sódio, evaporação
Ruyck e Ridder 2007	Leite	Tetraciclina	Ácido tricloroacético 20%, centrifugação, filtração, EFS*, evaporação.
Shao <i>et al.</i> 2007	Músculo, rim e fígado	Quinolonas e tetraciclina	Tampão McIlvaine/EDTA
Boglialli <i>et al.</i> 2008	Leite	Quinolonas e Fluorquinolonas	Extração com água (90 °C)
Hermo <i>et al.</i> 2008	Fígado (suíno)	Quinolonas	Ácido fosfórico:MeCN (73:27), filtração, EFS*
Hermo <i>et al.</i> 2008	Leite	Quinolonas e Fluorquinolonas	Acetonitrila, ácido tricloroacético, EFS*
Kaufmann <i>et al.</i> 2008	Fígado	Mais de 100 fármacos veterinários	Acetonitrila, sulfato de amônia, evaporação, hidróxido de amônia, centrifugação, EFS*
Turnipseed <i>et al.</i> 2008	Leite	Beta lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, fluorquinolonas, macrolídeos	Acetonitrila, centrifugação, ácido fórmico 0,1%, EFS*
Hoff <i>et al.</i> , 2009	Fígado (ave)	Sulfonamidas	Sulfato de sódio anidro, acetonitrila, centrifugação, evaporação
Tang <i>et al.</i> 2009	Leite	Fluorquinolonas	Acetonitrila com ácido acético 5%, evaporação e EFS*
Junza <i>et al.</i> 2011	Leite	Quinolonas, penicilinas e cefalosporinas	Comparação de 4 métodos diferentes, todos utilizando EFS*
Ruiz-Viceo <i>et al.</i> 2012	Leite	Fluorquinolonas	Ácido tricloroacético, centrifugação, tampão formiato de amônio, hidróxido de amônio e filtração.
Karageorgou <i>et al.</i> 2013	Leite	Cefalosporinas e fluorquinolonas	EFS* polimérico e QuEChERS**

* Extração em fase sólida; ** Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe.

3.4 Substâncias químicas de referência utilizadas na validação dos métodos propostos

A pureza das substâncias utilizadas como referência é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Para tanto, materiais de referência bem caracterizados e com pureza documentada devem ser utilizados para o estudo de validação. Material de referência certificado (MRC) é um material com conteúdo específico de substância a analisar (ICH, 2005a; 657/CE/2002). Na Tabela 3.5 encontram-se descritas as substâncias químicas de referência utilizadas na validação dos métodos multirresíduo.

Tabela 3.5. Substâncias Químicas de Referência utilizadas na validação dos métodos.

Compostos	Fornecedores	Grau de pureza (%)	Número CAS	Fórmula Molecular
Sulfadiazina	Sigma Aldrich	99,0	6835-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
Sulfametazina	Sigma Aldrich	99,4	1981-58-4	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ O ₂ SNa
Sulfametoxazol	Sigma Aldrich	98,0	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Sulfaquinoxalina	Sigma Aldrich	98,0	967-80-6	C ₁₄ H ₁₁ N ₄ NaO ₂ S
Sulfadimetoxina	Sigma Aldrich	99,0	122-11-2	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S
Sulfadoxina	Shering Plough	99,0	2447-57-6	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S
Sulfaclopiridazina	Sigma Aldrich	99,4	80-32-0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S
Sulfamerazina	Sigma Aldrich	99,0	127-79-7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S
Sulfapiridina (PI)	Sigma Aldrich	99,0	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S
Sulfatiazol	Sigma Aldrich	99,9	72-14-0	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂
Sulfizoxazol	Sigma Aldrich	99,9	127-69-5	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
Danofloxacino	Sigma Aldrich	99,9	112308-08-0	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃
Ácido Nalidíxico	Sigma Aldrich	99,0	7439-93-2	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃
Ácido Oxolínico	Sigma Aldrich	98,0	14698-29-4	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅
Flumequina	Riedel- de Haen	99,7	42835-25-6	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃
Enrofloxacino	Sigma Aldrich	99,9	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Ciprofloxacino	Sigma Aldrich	99,9	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Difloxacino	Sigma Aldrich	99,8	91296-86-5	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃
Norfloxacino	Sigma Aldrich	99,9	70458-96-7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Sarafloxacino	Sigma Aldrich	97,2	91296-87-6	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃
Enrofloxacino – D5 (PI)	Sigma Aldrich	99,0	1173021-92-5	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃ -D ₅
Tetraciclina	Sigma Aldrich	98,0	60-54-8	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈
Oxitetraciclina	Sigma Aldrich	98,1	2058-46-0	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₉
Clortetraciclina	Sigma Aldrich	93,1	57-62-5	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈
Demecoxiclina (PI)	Sigma Aldrich	93,7	64-73-3	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₂ O ₈
Doxiciclina	Sigma Aldrich	99,6	24390-14-5	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈
Trimetoprima	Sigma Aldrich	99,5	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
Bromexina	Sigma-Aldrich	98,0	611-75-6	C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N

3.5 Matrizes Alimentares

A complexidade das matrizes alimentares requer não somente o preparo exaustivo de amostras, mas também técnicas acopladas que são usadas por sua automação e vantagens. A manipulação das amostras deve evitar a possibilidade de uma contaminação acidental ou a perda das substâncias a analisar (657/CE/2002; BOGLIALLI e DI CORCIA, 2009).

3.5.1 Leite

Em leite, antibacterianos são resíduos químicos encontrados com bastante frequência tanto no Brasil como em outros países, sendo a principal fonte o manejo inadequado de fármacos no controle de mastites. O leite deve estar isento de contaminação por fármacos veterinários. Assim sendo, a presença dos mesmos é um fator que afeta negativamente a qualidade do leite e seus derivados (NERO *et al.*, 2007).

Constitui grande preocupação a presença de resíduos de antibacterianos no leite de consumo, uma vez que representam risco à saúde do consumidor e interferem na produção de derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes, causando também prejuízos econômicos. O leite e seus derivados são amplamente consumidos por bebês, crianças, adultos e idosos em todo o mundo. Os resíduos mais comumente encontrados em leite são fármacos veterinários como antibacterianos, hormônios, anti-helmínticos, agrotóxicos. Nos últimos anos, a ocorrência de resíduos de antibacterianos em leite tem sido um dos grandes desafios impostos à indústria dos alimentos, pelo fato de interferirem na manutenção de alguns produtos lácteos, causarem hipersensibilidade em humanos e aumentarem a resistência aos tratamentos com antibacterianos. A persistência de resíduos desses fármacos no leite varia com o agente e depende de vários fatores, como, por exemplo, dose e via de administração, excipiente utilizado e a solubilidade, entre outros. Pesquisas recentes demonstraram a influência do processo inflamatório da glândula mamária (mastite) na persistência de eliminação de resíduos de antibacterianos após o tratamento, seja por via intramamária ou sistêmica, muitas vezes além do período de carência preconizado. A clortetraciclina

tem um período mínimo de eliminação de 6 dias, já a oxitetraciclina de 4 dias (JAHED, 2007).

O leite pode ser considerado uma emulsão O/A, gotas de gordura em um meio aquoso. Portanto, o leite é uma emulsão complexa, sendo constituída por uma mistura de água, proteína, lipídios, enzimas, minerais, açúcar, entre outros compostos. Além disso, o leite não é homogêneo, contendo uma solução coloidal e proteínas globulares, uma dispersão de lipoproteínas e uma dispersão de micelas de caseína. A composição do leite pode variar de acordo com o armazenamento, pausterização, oxidação, crescimento de microrganismos e processos enzimáticos. Como o leite apresenta diferenças físico-químicas em suas fases, os fármacos podem distribuir-se diferentemente nas mesmas de acordo com suas características. A composição do leite está descrita na Tabela 3.6 (AERTS *et al.*, 1995).

Tabela 3.6. Composição do leite.

Componente	Quantidade/Valor
Água	87%
pH	6,7
Proteínas	3,3 % (caseína (78%), lactalbuminas, lactoglobulinas, imunoglobulinas, lactoferrina)
Lipídios	3,7 % (triglicerídeos (95%), fosfolipídeos (1%), colesterol (0,3%))
Carboidratos	4,7 % (Predominantemente lactose)
Enzimas	Peroxidase, fosfatase, lipase, xantina-oxidase
Vitaminas	A, D, E, K, B
Sais Minerais	0,7 % (Principalmente cálcio e fosfatos de potássio)
Inibidores	Aglutininas, peroxidases, lisozima

Fonte: AERTS *et al.*, 1995.

De acordo com a literatura, a extração líquido/líquido é a mais descrita para matrizes líquidas como o leite (BOGLIALLI e Di CORCIA, 2009). Para a matriz leite, o metanol é o solvente que possibilita a maior recuperação dos analitos, mas o extrato final apresenta-se turvo. A turbidez do extrato se deve, provavelmente, à ineficiente precipitação das proteínas (MOL *et al.*, 2008; KAUFMANN *et al.*, 2011). A acetonitrila é um solvente que possibilita recuperação satisfatória dos analitos a partir do processo de extração, minimizando co-extração de lipídios e com eficiência no processo de desnaturação das proteínas (CHIAOCHAN *et al.*, 2010). Além disso, acetonitrila é miscível em água e promove a extração em uma fase única (LEHOTAY *et al.*, 2001; PRESTES *et al.*, 2009).

No presente trabalho foram utilizados diferentes tipos de leite. Amostras comerciais de leite UHT integral e desnatado foram adquiridas em mercado local. Os leites *in natura* foram obtidos de produtores de diferentes localidades do Brasil. A diversidade de amostras é importante no desenvolvimento de métodos robustos, adequados para a análise de leites com diferentes composições.

3.5.2 Fígado

Os tecidos animais sempre requerem um tratamento prévio para a obtenção de uma amostra homogênea. A extração líquida de tecidos triturados e homogeneizados como o fígado é referida como extração em fase líquida (BOGLIALLI E DI CORCIA, 2009). O fígado é rico em íons, tais como cálcio, sódio, potássio e quantidades significativas de ferro, explicando sua utilização em anemias ferropriva. Desta forma, para a análise das tetraciclina deve-se utilizar um agente complexante como, por exemplo, o EDTA, já que esses compostos quelam com os metais existentes nessa matriz. Para análise de medicamentos em fígado, deve-se dar atenção especial ao processo extrativo devido à alta quantidade de gordura presente. A gordura pode ser responsável pela obtenção de extratos turvos, portanto a matriz deve passar por um processo de *clean up* para diminuir a presença deste coextrativo nas análises (BERENDSEN *et al.*, 2013).

O fígado pode ser utilizado como uma importante matriz devido à elevada quantidade de resíduos que pode ser encontrada, já que é o tecido responsável pela metabolização de muitos fármacos. O fígado contém sistemas ativos de enzimas metabólicas que podem levar a uma biotransformação de fármacos *in vitro*, o que pode deixar mais complexa a análise de determinadas substâncias (AERTS *et al.*, 1995). Poucos trabalhos foram publicados para a análise de resíduos de antibacterianos em fígado bovino, tornando essa matriz um alvo importante para investigação.

4 CAPÍTULO I – DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTIBACTERIANOS EM LEITE E FÍGADO BOVINOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE

4.1 Introdução

A análise qualitativa de antibacterianos em produtos de origem animal é uma estratégia importante para detecção desses contaminantes nos alimentos, amplamente consumidos pela população. Normalmente, os testes qualitativos são baseados na inibição do crescimento microbiano, testes imunológicos e testes enzimáticos com receptores específicos (BLASCO *et al.*, 2009) Porém, esses métodos são pouco sensíveis e podem gerar resultados falso-positivos (GENTILLI *et al.*, 2005).

A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas em série torna possível a identificação de traços de antibacterianos em matrizes complexas (GENTILLI *et al.*, 2005). Há uma tendência para a análise de resíduos com a utilização de métodos mais genéricos que possam detectar uma ampla gama de compostos em uma única corrida analítica (BERENDSEN *et al.*, 2013). Desta forma, a utilização das vantagens de seletividade e sensibilidade da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série pode contribuir muito com a capacidade operacional de laboratórios envolvidos em análise de resíduos.

Uma vantagem importante relacionada aos métodos qualitativos de triagem é que a maioria deles são baseados em procedimentos de preparação de amostra simples, rápidos e de baixo custo, características fundamentais para essa abordagem (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2010). Além disso, o processo de validação não envolve tantas etapas como as exigidas para métodos quantitativos (STEAD *et al.*, 2011). Tendo em vista a importância dos métodos qualitativos eficientes para o fluxo de trabalho de um laboratório de rotina de análise de resíduos, um método com tais características foi proposto nesse trabalho.

4.2 Artigo

O artigo **A simple and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry** foi publicado na revista *Talanta* (v.129, p.374-383, 2014), doi-10.1016/j.talanta.2014.04.049. Este artigo descreve o desenvolvimento e a validação de um método qualitativo para a determinação de quinolonas, fluorquinolonas,

tetraciclinas, sulfonamidas e trimetoprima em leite e fígado bovinos utilizando-se LC-MS/MS (p. 53 - p. 75).

Resumo

Em laboratórios de rotina, métodos de *screening* multiclasse são capazes de processar um número elevado de amostras em um curto espaço de tempo. O maior desafio é desenvolver uma metodologia capaz de detectar diferentes analitos de diferentes classes combinando a simplicidade do método com um custo viável para os laboratórios. Uma técnica eficiente para análise de resíduos de antibacterianos de diferentes classes (fluorquinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas e trimetoprima) foi desenvolvido baseado numa extração simples e com a utilização de pequenas quantidades de solvente para o leite e fígado bovinos. Etanol acidificado foi utilizado como solvente de extração para amostras de leite. Para a matriz fígado, utilizou-se areia tratada com EDTA para a maceração do tecido, água, metanol e acetonitrila acidificada como solventes de extração. Um total de 24 antibacterianos foram incluídos nos métodos propostos e analisados por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). No fígado bovino a sulfaquinoxalina-OH, metabólito da sulfaquinoxalina, também foi incluída. O processo de validação para o método de *screening* foi realizado de acordo com a diretiva 657 da União Europeia ((2002/657/UE). A capacidade de detecção (CC β) foi determinada para cada matriz e para cada analito, obtendo-se valores inferiores a 0,5 x LMR para a maioria dos analitos. A especificidade e robustez foram avaliadas no presente trabalho. Amostras de rotina contaminadas ou não foram analisadas por meio dos métodos propostos. Os resultados demonstraram que o método detectou adequadamente amostras contaminadas que foram confirmadas posteriormente por meio de método quantitativo e confirmatório. Além disso, os resultados demonstraram que os métodos multirresíduo propostos são uma importante ferramenta de análise para laboratórios de rotina envolvidos na determinação de resíduos de medicamentos.

5 CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE QUINOLONAS, FLUORQUINOLONAS, TETRACICLINAS, SULFONAMIDAS, TRIMETOPRIMA E BROMEXINA EM LEITE BOVINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE

5.1 Introdução

Os antibacterianos são amplamente utilizados no gado leiteiro para o tratamento de mastite, metrite e outras enfermidades, podendo gerar resíduos dessas substâncias no leite (SCHNEIDER *et al.*, 2009). Diversos métodos são utilizados para a determinação de antibacterianos em leite. Primeiramente pode-se utilizar um método qualitativo para a identificação do composto e aproximação da quantidade em que o mesmo está presente. Posteriormente, um método quantitativo e confirmatório é necessário. A utilização de um método quantitativo exclusivo para cada classe, possibilita um aumento de seletividade quando comparado ao que envolve um número elevado de analitos (BERENDSEN, 2013).

Os métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas requerem um processo de preparo de amostra menos elaborado quando comparado à cromatografia líquida com detecção ótica. O tratamento de matrizes alimentícias requer procedimentos para a desproteínização, remoção de gorduras e açúcares (CARIERI *et al.*, 2002). Para tanto, muitos métodos utilizam a extração em fase sólida (EFS) para o preparo das amostras. Porém, extrações menos complexas podem ser aplicadas ao leite. A acetonitrila e o etanol foram anteriormente descritos na literatura para análises de antibacterianos em leite, demonstrando ser uma alternativa interessante para laboratórios envolvidos com um grande número de amostras. Desta forma, métodos simples, baratos e rápidos, utilizando-se solventes usuais em pouco volume foram desenvolvidos e otimizados para análises quantitativas e confirmatórias em leite.

5.2 Artigo

A seguir encontra-se o artigo submetido ao periódico *International Dairy Journal*. Este artigo descreve a validação e aplicação de três diferentes métodos para a determinação de fluorquinolonas, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprima e bromexina em leite bovino (p. 80 – p. 103).

Determination of fluoroquinolones, tetracyclines, sulfonamides, bromexine and trimethoprim in bovine milk by different methods using LC-MS/MS: combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis

Resumo

Antibacterianos são amplamente utilizados na medicina veterinária e resíduos desses fármacos podem remanescer em alimentos de origem animal como o leite. Métodos simples, rápidos de baixo custo e com utilização de pouco volume de solvente foram desenvolvidos para a determinação de quinolonas e fluorquinolonas, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprima e bromexina em leite bovino. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) foi a técnica utilizada para o desenvolvimento dos métodos. Apesar das diferenças dos limites máximos de resíduos permitidos (LMRs) que variam de acordo com o fármaco (10 a 100 ng mL⁻¹), os métodos foram considerados satisfatórios em relação aos parâmetros avaliados. Foram obtidas recuperações aceitáveis entre 62 e 108%. A linearidade (r^2) obtida foi acima de 0,96, considerando três dias diferentes, sendo que as concentrações variaram entre 0 até 2 vezes o valor do LMR. A precisão intradia foi abaixo de 15,0% e a precisão interdia abaixo de 17,3% nas três concentrações avaliadas, 0,5; 1,0 e 1,5 x LMR. A exatidão do método variou entre 87 e 108%. Os limites de detecção e quantificação, bem como o limite de decisão (CC_α) e a capacidade de detecção (CC_β) também foram avaliados. A robustez e a aplicabilidade foram avaliadas em amostras de leite recebidas pelo laboratório desde 2011 e estão sendo constantemente verificadas.

6. CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE FLUORQUINOLONAS, TETRACICLINAS E SULFONAMIDAS EM FÍGADO BOVINO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

6.1 Introdução

O fígado bovino é uma importante matriz a ser analisada no que se refere à determinação de resíduos de antibacterianos. Essa matriz é utilizada como alvo de investigação por ser um alimento bastante consumido pela sua riqueza em ferro. Além disso, pode apresentar níveis altos de resíduos por ser sítio de metabolização de medicamentos pela presença de sistemas enzimáticos como citocromo P₄₅₀ e atividade de redutases (AERTS *et al.*, 1995).

A preparação de amostras extremamente complexas como o fígado é um desafio em procedimentos analíticos (STTUBINGS e BIGWOOD, 2009). Normalmente utilizam-se diversas etapas para que se obtenha uma amostra adequada para análises por cromatografia e detecção por espectrometria de massas. Porém, o método extrativo não pode ser demasiadamente complexo a ponto de impedir que a análise seja adequada para rotinas em laboratórios que recebem um elevado número de amostras (STOLKER *et al.*, 2007).

Não há muitos trabalhos publicados envolvendo a análise de medicamentos veterinários em fígado. Os antibacterianos são amplamente utilizados e podem gerar resíduos. O emprego de CL-EM/EM é a técnica de escolha para esse fim. Desta forma, um método contemplando diferentes classes foi desenvolvido para o controle da contaminação de antibacterianos em fígado bovino, sendo a aplicabilidade avaliada com matrizes de outras espécies como fígado suíno e de aves.

6.2 Artigo

A seguir encontra-se o artigo submetido ao periódico *Food Additives and Contaminants* (p.108 – p. 128). Este artigo descreve o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação de quinolonas, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas em fígado bovino. O trabalho também apresenta a aplicação em fígado de ave e suíno. O fármaco trimetoprima não foi incluído no artigo por não apresentar resposta satisfatória nos parâmetros de validação. A recuperação obtida foi de 55%. O coeficiente de determinação (r^2) apresentou valor de 0,8780. Esses resultados requerem mais estudos. Alguns autores sugerem a presença de algumas enzimas do fígado que podem permanecer

mesmo após a morte do animal (AERTS *et al.* 1995). Essas enzimas podem metabolizar medicamentos mesmo *in vitro*. Um exemplo é a metabolização da sulfaquinoxalina que sofre hidroxilação e forma um produto com massa 317 (HOFF *et al.* 2012). É importante salientar também que, num método multiresíduo/multiclasse, alguns analitos podem ser prejudicados em detrimento de outros (GRANELLI *et al.*, 2007).

Determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine liver using LC-MS/MS

Resumo

Resíduos de antibacterianos podem ser encontrados em alimentos de origem animal. Entre esses alimentos o fígado está incluído, já que é fonte de ferro importante para a nutrição. Esse trabalho descreve um método simples, rápido, de baixo custo e com a utilização de pouco volume de solvente para a determinação de quinolonas, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas em amostras de fígado bovino. As amostras de fígado homogeneizadas foram extraídas com acetonitrila acidificada. Etapas de *cleanup* sem a utilização de extração em fase sólida (SPE) foram propostas no presente método. O extrato final foi analisado por LC-MS/MS. As recuperações obtidas foram aceitáveis entre os valores de 66 a 110%. A linearidade (r^2) acima de 0,96, considerando três dias diferentes em concentrações variando entre 0 e 2,0 x LMR. A precisão intradia obtida abaixo de 14,7% e precisão interdia abaixo de 18,8% para as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 x LMR estão em consonância com as especificações. A exatidão do método variou entre 86 a 110%. Os limites de detecção e quantificação, bem como o limite de decisão (CC_α) e a capacidade de detecção (CC_β) também foram avaliadas.

A análise de resíduos de antibacterianos em matrizes alimentares vem se tornando uma prática indispensável, tanto para a economia, quanto para a saúde do consumidor. Desta forma a elaboração de métodos capazes de detectar e quantificar resíduos são de suma importância, inclusive na análise de misturas de contaminantes que podem estar presentes (FARRÉ e BARCELÓ, 2013). Porém, a aplicabilidade e os custos envolvidos nas análises devem ser levados em conta para que o método possa ser viável em análises de rotina.

Os antibacterianos selecionados para este estudo são amplamente utilizados em medicina veterinária. Por exemplo, pesquisas recentes demonstraram que as tetraciclinas ocupam o segundo lugar em produção e uso de antibióticos em todo o mundo, sendo que em alguns países como, por exemplo, a China, esses fármacos ocupam a primeira posição. São considerados os antibióticos mais baratos disponíveis no mercado, portanto são atrativos para países em desenvolvimento (MICHALOVA *et al.*, 2004). As sulfonamidas são um consenso no que diz respeito a sua monitorização. Isto ocorre devido ao potencial carcinogênico que alguns desses fármacos possuem como, por exemplo, a sulfametazina (ROCA *et al.*, 2013).

A ideia de desenvolver um método baseado em extração genérica para as análises qualitativas, com poucos volumes de solvente foi alcançada, pois as características dos fármacos analisados permitiram. Alguns ajustes foram necessários nos métodos específicos para cada classe de antibacterianos. Devido à presença de ácido carboxílico e um ou vários grupos funcionais amina, as quinolonas apresentam características anfotéricas (SARKOZY *et al.*, 2001), desta forma, em todos os métodos envolvendo as quinolonas e fluorquinolonas foi utilizado o ácido fórmico junto ao solvente de extração. A acidificação proporcionou uma solubilização maior desses antibacterianos. A característica hidrofílica acentuada das tetraciclinas permitiu uma extração simples com um solvente polar como o etanol (DAGHRIR e DROGUI, 2013). As sulfonamidas também apresentaram bons resultados com solventes usuais, vindo ao encontro da ideia inicial.

Uma questão importante no desenvolvimento dos métodos extrativos foi a viabilidade que os mesmos teriam para a análise de um grande número de amostras. Portanto, a elaboração de um método rápido, de fácil execução, de baixo

custo e, além disso, com a utilização de pouca quantidade de solvente no processo extrativo, foram pontos essenciais no desenvolvimento dos métodos. A utilização de pouco solvente veio ao encontro com a ideia de preservação do analista e do meio ambiente.

O mecanismo de ionização na interface dos equipamentos de LC- MS é responsável pelo efeito matriz. Isto ocorre com ionização por eletrospray (ESI), não ocorrendo em fontes APCI (MATUSZEWSKI, *et al.*, 2003). Devido às características dos fármacos estudados, principalmente a sua polaridade, a fonte de ionização utilizada foi o eletrospray. Desta forma, o efeito matriz foi observado em todos os métodos propostos. É importante salientar que a curva em matriz deve ser realizada juntamente com as amostras a serem analisadas. Além disso, a matriz a ser utilizada deve ser o mais semelhante possível das amostras. No caso do leite, diferentes tipos de leite com diferentes características foram testados como o leite UHT desnatado, leite UHT integral, leite em pó, leite *in natura*. A curva padrão para cada um destes apresentou inclinação da reta diferente, demonstrando a importância da utilização de um leite com as mesmas características. Desta forma, a utilização de padrão interno, bem como a adoção de curva em matriz nas análises de rotina se torna fundamental para a correta determinação e quantificação dos antibacterianos.

A razão iônica é um parâmetro que se deve monitorar durante as análises de rotina. A tolerância depende da intensidade relativa entre o íon precursor e o íon qualificador (% pico base). Deve-se avaliar essa relação em cada lote de análise, já que o mesmo consiste em mais uma ferramenta que corrobora o método em questão. Para intensidades superiores a 50% do pico base, a tolerância é de $\pm 20\%$, para intensidades entre 20 e 50% do pico base, a tolerância é de $\pm 25\%$ e entre 10 e 20% do pico base a tolerância é de $\pm 30\%$ (657/2002/UE). Durante a validação esse parâmetro foi verificado para todos os analitos, estando de acordo com as tolerâncias exigidas.

Os lotes de análise consistem em amostras e controles. As amostras a serem analisadas devem estar em condições adequadas (congeladas) e são preparadas da mesma maneira que os controles, exceto pela fortificação com os antibacterianos. Os controles para um método de triagem consistem em amostra branca, 3 amostras no valor determinado de $CC\beta$, 1 amostra no valor de $0,5xLMR$, 1 amostra no valor

do LMR, 1 amostra no valor de 1,5xLMR e 03 amostras fortificadas após o processo de extração (*tissue standard*). Para os métodos confirmatórios utiliza-se uma amostra branca, uma curva padrão na matriz, 3 amostras no valor do LMR, 3 amostras fortificadas após o processo de extração (*tissue standard*). A curva em matriz corrige os problemas relacionados ao efeito de matriz.

A aplicabilidade e robustez dos métodos propostos foram verificadas por meio da análise de amostras reais recebidas pelo laboratório. Essa variabilidade de amostras possibilitou que os métodos fossem testados perante diferentes amostras, levando em consideração a diferença que pode existir entre as mesmas com relação a sua composição. Para a matriz fígado, pode-se avaliar a resposta do método em amostras de diferentes espécies como bovino, suíno e ave. Além disso, os métodos propostos apresentaram-se robustos em diferentes equipamentos de LC-MS/MS. Isto torna-se importante em laboratórios de rotina em que diferentes análises são executadas diariamente e nem sempre a mesma máquina encontra-se disponível.

Apesar de existirem diversos trabalhos publicados na área de resíduos para a matriz leite, os métodos propostos foram baseados na simplicidade de execução, baixo custo, rapidez de preparo de amostras e reduzido volume de solventes orgânicos para possibilitar a análise de um número elevado de amostras num mesmo dia e ser o menos nocivo possível ao ambiente e aos analistas. Estas características foram as principais vantagens comparadas aos métodos até então encontrados na literatura.

A matriz fígado, por ser mais complexa, exigiu um tratamento mais elaborado da amostra, mas também apresentou vantagens com relação a simplicidade, baixo custo, rapidez, fácil execução e quantidade reduzida de solvente de extração. Todos os métodos também foram desenvolvidos para serem financeiramente viáveis por se tratarem de análises de rotina. A possibilidade de testar os métodos em amostras reais permitiu que os mesmos fossem avaliados constantemente. A avaliação real das vantagens e desvantagens dos métodos possibilitou a realização de ajustes quando necessário. Uma particularidade da matriz fígado é a possibilidade de ocorrer metabolização *in vitro* de alguns analitos. Foi observada a metabolização da

sulfaquinoxalina em sulfaquinoxalina hidroxilada, portanto esse metabólito foi monitorado para avaliar a presença da sulfaquinoxalina (HOFF *et al.*, 2012).

Diante do exposto, tanto os métodos qualitativos como os métodos quantitativos e confirmatórios cumpriram os objetivos propostos. A utilização de um método qualitativo genérico para diversos antibacterianos e a possibilidade de quantificação e confirmações em métodos classe específicos é uma estratégia importante e eficiente no que diz respeito à análise de resíduos. Essa afirmação está sendo corroborada pela implementação de tais métodos na rotina para amostras reais provenientes de diferentes produtores. Adicionalmente, métodos que agreguem características de preservação ao meio ambiente vêm ganhando espaço nos dias atuais. Em síntese, os métodos propostos irão colaborar para o controle de resíduos de antibacterianos em leite e fígado bovinos.

O método qualitativo proposto para a análise de sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas e fluorquinolonas, bem como para a trimetoprima em leite bovino foi considerado adequado para análises de rotina. As características de simplicidade, rapidez de execução, baixo custo e pouca utilização de solventes foram as principais vantagens em relação ao método proposto. A inclusão de diferentes analitos de diferentes classes enriqueceu o método de *screening*, possibilitando que apenas amostras suspeitas sejam reanalisadas para confirmação e quantificação, já que apenas um pequeno número de amostras encontra-se contaminada.

O método qualitativo proposto para a análise de sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas e fluorquinolonas, bem como para a trimetoprima em fígado bovino foi considerado adequado para análises de rotina. Este método apresentou uma etapa de dispersão em fase sólida, com a utilização de areia, um material barato que apresentou resultados satisfatórios para a matriz fígado. O monitoramento de metabólito de sulfaquinoxalina é importante para detectar a presença da sulfaquinoxalina.

O método quantitativo proposto para a análise de quinolonas e fluorquinolonas em leite bovino apresentou-se satisfatório para a quantificação e confirmação desses analitos. O método proposto é extremamente rápido, com utilização de quantidades bem pequenas de solvente de extração (600 μ L), de simples execução e viável economicamente. Apesar da simplicidade, o mesmo apresentou parâmetros conformes para análise confirmatória, bem como para a quantificação dos analitos. Dentre as amostras de rotina que foram submetidas ao método qualitativo, 04 apresentaram-se suspeitas para o ciprofloxacino e duas para o enrofloxacino e, conseqüentemente, seu metabólito majoritário que é o ciprofloxacino. As mesmas foram submetidas ao método quantitativo e confirmadas com a presença destes analitos, mas abaixo do LMR.

O método quantitativo proposto para a análise de sulfonamidas, trimetoprima e bromexina em leite bovino apresentou-se satisfatório para a quantificação e confirmação desses analitos. O método proposto é extremamente rápido, com utilização de quantidades bem pequenas de solvente de extração (600 μ L), de simples execução e viável economicamente. Apesar da simplicidade, o mesmo

apresentou parâmetros conformes para análise confirmatória, bem como para a quantificação dos analitos. Dentre as amostras de rotina que foram submetidas ao método qualitativo, nenhuma apresentou a presença desses analitos.

O método quantitativo proposto para a análise de tetraciclinas em leite bovino apresentou-se satisfatório para a quantificação e confirmação desses analitos. O método proposto é extremamente rápido, com utilização de quantidades bem pequenas de solvente de extração (600 µL), de simples execução e viável economicamente. Apesar da simplicidade, o mesmo apresentou parâmetros conformes para análise confirmatória, bem como para a quantificação dos analitos. Dentre as amostras de rotina que foram submetidas ao método qualitativo, 06 apresentaram-se suspeitas para oxitetraciclina e uma para tetraciclina. As mesmas foram submetidas ao método quantitativo e confirmadas com a presença destes analitos, mas abaixo do LMR. Porém, uma amostra apresentou valores quase 10 vezes superior ao LMR para a oxitetraciclina.

O método quantitativo proposto para a análise de sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas e fluorquinolonas em fígado bovino apresentou-se satisfatório para a quantificação e confirmação desses analitos. Apesar de ser multirresíduos e multiclasse, o presente método foi validado para a confirmação e quantificação dos analitos propostos. Fígados de diferentes espécies foram analisados e pode-se detectar, quantificar e confirmar a presença de sulfaquinoxalina em concentrações abaixo do LMR em duas amostras de fígado de ave.

REFERÊNCIAS

AERTS, M.M.; HOGENBOOM, BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**, v. 667, p.1-40, 1995.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e Introducción al análisis farmacéutico. In:_____. **Introducción a La Química Farmacéutica** – Madrid: Intramericana McGraw-Hill, 1993.

BERENDSEN, B.J.A.; STOLKER, L.A.A.M.; NIELEN, M.W.F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 229-239, 2013.

BITTENCOURT, M.S.; MARTINS, M.T.; ALBUQUERQUE, F.G.S.; BARRETO, F.; HOFF, R.B. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis in meat using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum simple preparation procedure. **Food Additives and Contaminants**, v.29(4), p.508-516, 2012.

BLASCO, C.; DI 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.

BOGLIALLI, S.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; NICOLARDI, S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. **Food Chemistry**, v. 108, p. 354-360, 2008.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e

bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRONSEMA, K.J.; BISCHOFF, R.; VAN DER MERBEL, N.C. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.893-894, p.1-14, 2012.

CARERI, M.; BIANCHI, F.; CORRADINI, C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p.3-64, 2002.

CHÁFER-PÉRICAS, C.; MAQUIEIRA, Á.; PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food sample. **Trends in analytical chemistry**, v. 29, p. 1038-1049, 2010.

CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D.M.; LU, Z.; MAZZEO, J.R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC-MS/MS analysis. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 852, p.22-34, 2007.

CHIAOCHAN, C.; KOESUKWIWAT, U.; YUDTHAVORASIT, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. **Analitica Chimica Acta**, v.682(1-2), p.117-129, 2010.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS: Disponível em:

<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html>

Implementing Council Directive 96/23/EC. On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products. **Official**

Journal of European Communities, L125, 10-31, (Disponível em: <http://europe.eu.int>).

COMMISSION DECISION 2002/657/EC. Implementing Council Directive 2011/37/EC, Commission Decision 2010/37/EC. (2010). Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Communities*, L15, 01-72.

COMMISSION DECISION 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. **Official Journal of European Communities**, L239, 66-98, 2002. (Disponível em: <http://europe.eu.int>).

CORPET, D.E. Microbiological hazards for humans of antimicrobial growth promoter use in animal production. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.147, p.851-822, 1996.

DOGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracyclines antibiotics in the environment: a review. **Environmental Chemistry Letters**, DOI 10.1007/s 10311-013-0404-9, *open access*, 2013.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis of emerging contaminants in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 240-253, 2013.

GAUGAIN-JUHEL, M.; DELÉPINE, B.; GAUTIER, S.; FOURMOND, M.P.; GAUDIN, V.; HURTAUD-PESSEL, D.; VERDON, E.; SANDERS, P. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. **Food additives and contaminants**. p. 1-13, 2009.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.7, p.704-733, 2005.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M.C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.3929-3937, 2010.

GOTO, T.; ITO, Y.; YAMADA, S.; MATSUMOTO, H.; OKA, H. High-throughput analysis of tetracyclines and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition. *Journal of Chromatography A*, v.1100, p.193-199, 2005.

GRANELLI, K.; BRANZELL, C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. ***Analytica Chimica Acta***, v.586, p. 289-295, 2007.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass. *Journal of Chromatography A*. Article in Presss, 2013.

HERMO, M.P.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples high-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection. ***Journal of Chromatography A***, v. 1201, p. 1-14, 2008.

HERMO, M.P.; NEMUTLU, E.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC-UV, LC-FD, LC-MS and LC-MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. ***Analytica chimica acta***, v. 613, p. 98-107, 2008.

HOFF, R.B.; BARRETO, F.; KIST, T.B.L. Use of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography-tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according to European Union 2002/657/EC. ***Journal of Chromatography A***, v.1216, p. 8254-8261, 2009.

HOFF, R.B.; BARRETO, F.; MELLO, J.; JANK, L.; PERALBA, M.C.R.; PIZZOLATO, T.M. Characterization and estimation of sulfaquinoxaline metabolites in animal tissues using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. ***Analytical Methods***, v. 4, p. 2822-2830, 2012.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005a.

JAHED K. Chemical contaminants in milk and public health concerns: a review. **International Journal of Dairy Science**, v.2(2), p. 104-115, 2007.

JEMAL, M.; OUYANG, Z. ZIA, Y.-Q. Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance usage of incurred sample and well thought-out chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 24(1), p.2-19, 2010.

JUNZA, A.; AMATYA, R.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Comparative study of the LC-MS/MS and UPLC-MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk and validation according to the regulation 2002/657/EC. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 879 (25), p. 2601-2610, 2011.

KARAGEORGOU, E.; MYRIDAKIS, A.; STEPHANOU, E.G.; SAMANIDOU, V. Multiresidue LC-MS/MS analysis of cephalosporins and quinolones in milk following ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersive extraction combined with the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe methodology, **Journal of Separation Science**, v. 36(12), p. 2020-2027, 2013.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1194, p. 66-79, 2008.

KOESUKWIAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines and pyrimethamine in bovine's Milk. **Journal of Chromatography A**, v.1140, p.147, 2007.

KREUZIG, F.; SHERMA, J.; FRIED, B. **Antibiotics in hand book of TLC**. New York: Marcel Decker, p. 445, 1996.

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**, v. 105, p.1726-1731, 2007.

LEHOTAY, S.J.; LIGHTFIELD, A.R.; HARMAM-FETCHO, J.A.; DONOGUE, DJ. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 4589-4596, 2001.

LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A.R.; NUÑES, A.; DUTKO, T.; NG, C.; BLUHM, L. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1313, p. 103-112, 2013.

LOPES, R.P.; PASSOS, E.E.F.; ALKIMIM FILHO, J.F.; VARGAS, E.A.; AUGUSTI, D.V.; AUGUSTI, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 192-198, 2012.

MAPA- Instrução Normativa IN/08/2010, 29 abril de 2010.

MARTINS, M.T.; MELO, J.; BARRETO, F.; HOFF, R.B.; JANK, L.; BITTENCOURT, M.S.; ARSAND, J.B.; SCHAPOVAL, E.E.S. A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p.374-383, 2014.

MARTINS-JUNIOR, H.A.; KUSSUMI, T.A.; WANG, 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(2), p.397-405, 2007.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, p.3019-3030, 2003.

MAURICIO, A. Q.; LINS, E. S.; ALVARENGA, M. B. A national residue control plan from the analytical perspective – The Brazilian case. **Analytica Chimica Acta**, v.637, p.333-336, 2009.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. An ideal solvent for gas chromatographic (GC) analysis. **Journal of chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MOL, H.G.J.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ZOMER, P. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices. **Analytical Chemistry**, v. 80, p.9450-9459, 2008.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinarni Medicina**, v. 49, p. 79-100, 2004.

NERO, C.A.; DE MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.D.M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27(2). P. 391-393, 2007.

ORTELLI, D.; COGNARD, E.; JAN, P.; EDDER, P. Comprehensive fast multiresidue of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, V. 877, p. 2363-2374, 2009.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS-Um método moderno de preparo de ampstra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

ROCA, M.; ALTHAUS, R.L.; MOLINO, M.P. Thermodynamic analysis of the thermal stability of sulfonamides in milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. **Food Chemistry**, v. 136, p.376-383, 2013.

RUIZ-VICEO, J.A.; ROSALES-CONRADO, N.; GUILLÉN-CASLA, V.; PÉREZ-ARRIBAS, L.V.; LÉON-GONZALÉZ, M.E. Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine Milk using capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 28, p. 99-106, 2012.

RUYCK, H.D.; DE RIDDER, H. Determination of tetracycline in cow's milk by liquid chromatography /tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1511-1520, 2007.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. (1 Ed.) São Paulo: Manole, 2007 (cap. 22).

SARKOZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Veterinary Medicine**, v. 46, p.257-274, 2001.

SHAO, B.; JIA, X.; WU, Y.; HU, J.; TU, X.; ZHANG, J. Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.21, p.3487-3496, 2007.

SCHNEIDER, M.J.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S.J.; LIGHTFIELD, A.R.; KINSELLA, B.; SHULTZ, C.E. Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 290-297, 2009.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária** (5ª Ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011 (cap. 39-42).

STEAD, S.L.;WOLODKO,-CIERNIAK, K.B.; RICHMOND, S.F.; SHARMAN, M.; DRIVER, P.; TEALE, P.; LEONARDOVA, O.; PURVIS, D. Development and

validation of a potentiometric biosensor assay for tylosin with demonstrated applicability for the detection of two other antimicrobial growth-promoter compounds in feedstuffs. **Food Additives and Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control Exposure & Risk Assessment**, v. 28, n. 7, p. 848-859, 2011.

STOLKER, A.A.M.; ZUIDEMA, T.; NIELEN, M.W.F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. **Trends in analytical chemistry**, v. 26, p.967-979, 2007.

STOLKER, A.A.; RUTGERS, P.; OOSTERINK, E.; LASAROMS, J.J.P.; PETERS, R, J.B.; VAN RHIJN, J.A.; NIELEN, M.W.F. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 2309-2322, 2008.

STOKSTAD, E.L.; JUKES, Y.H. The multiple nature of the animal protein factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.180(2), p.647-654, 1949.

STTUBINGS, g.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v.637, p.68-78, 2009.

TANG, Q.; YANG, T.; TAN, X.; LUO, J. Residues in milk sample by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4535-4539, 2009.

TURNIPSEED, S.B.; ANDERSEN, W.C.; KARBIWNYK, C.M.; MADSON, M.R. MILLER, K.E. Multiclass, Multiresidue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk. **Rapid communication in mass spectrometry**, v.22, p.1467-1480, 2008.

VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G.; AGUILERA-LUIZ, M.M; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p.2777-2790, 2010.

WILLIAMSON, L. N.; BARTLETT, M.G. Quantitative Liquid Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v.21, p.567-576, 2007.