

PROGRAMA DE PÓS GRADUÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Rafaela Pinto da Costa

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ANTIBIÓTICO MACROLÍDEO TILOSINA EM LEITE
SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTOS TÉRMICOS**

Rio de Janeiro

2014

Rafaela Pinto da Costa

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ANTIBIÓTICO MACROLÍDEO TILOSINA EM LEITE
SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTOS TÉRMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dra. Bernardete Ferraz Spisso

Orientador: Dr. Armi Wanderley da Nóbrega

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Costa, Rafaela Pinto da

Avaliação da estabilidade do antibiótico macrolídeo tilosina em leite submetido a diferentes condições de processamentos térmicos / Rafaela Pinto da Costa. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

152 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Bernardete Ferraz Spisso e Armi Wanderley da Nóbrega

1. Leite. 2. Tilosina. 3. Resíduos de Drogas. 4. Controle de Qualidade. 5. Vigilância Sanitária. I Título

Título: Evaluation of the stability of the tylosin macrolide antibiotic in milk submitted to
diferente conditions of termal processing

Rafaela Pinto da Costa

**AValiação DA ESTABILIDADE DO ANTIBIÓTICO MACROLÍDEO TILOSINA EM
LEITE SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTOS
TÉRMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Silvana do Couto Jacob (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lourdes Maria Pessôa Masson (Doutora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos meus familiares, amigos e namorado por todo apoio, amor e dedicação em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos da minha vida, auxiliando-me nos momentos mais difíceis permitindo que tudo isso pudesse ser realizado.

Aos meus pais, Mauricio e Mirian, que através de toda dedicação durante todos os dias de minha vida foram fundamentais para mais essa conquista.

Aos meus irmãos, Mauricio, Erika e Karina, por todo apoio, carinho e torcida para que esta etapa logo se cumprisse.

Ao meu amor, Antonio Carlos, que me apoiou de diversas maneiras durante esta importante etapa da minha vida e compreendeu minha ausência com carinho e atenção.

À minha orientadora, Doutora Bernardete Spisso, pela amizade, dedicação, entusiasmo e ensinamentos durante toda a trajetória deste projeto, não me permitindo desanimar nos momentos mais difíceis, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Doutor Armi da Nóbrega, pela confiança e motivação para a pesquisa e o ensino e pelas oportunidades oferecidas.

Às minhas companheiras e amigas do laboratório, Mararlene, Mychelle e Rosana, pela alegria, dedicação, paciência e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de trabalho, Jair, Júlia e Leandro, pelos momentos de descontração e pela valiosa ajuda para o cumprimento deste trabalho.

Às minhas amigas Juliana, Patrícia e Vânia, por compartilhar comigo alguns dos momentos mais importantes do desenvolvimento deste trabalho com paciência, lanchinhos e muitas risadas.

Ao professor André Mazzei pelo incentivo e conhecimento compartilhado.

À coordenadora do curso de pós-graduação, Kátia Cristina, pela disponibilidade, compreensão, atenção e confiança para a realização desta dissertação.

À Faperj pela bolsa concedida.

A Sylvain Tranchand (Allcrom) pela doação dos kits QuEChERS roQ para teste.

A Hélio Alves Martins Júnior e Mateus Gulart Campos (AB Sciex) pela viabilização do uso do equipamento TriploTOF 5600 nas instalações do laboratório de demonstração da empresa, valiosas contribuições e agradável recepção em São Paulo.

À Angela Furtado (Embrapa Agroindústria de Alimentos, Centro de Tecnologia Agrícola Alimentar – CTAA) pela oportunidade do uso das instalações da Planta Piloto de Operações Unitárias II, imprescindíveis à execução deste trabalho.

É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.

Los Hermanos

RESUMO

O possível risco à saúde pública associado à presença de resíduos de antibióticos no leite é bastante discutido na literatura científica, porém, há poucas informações sobre os efeitos dos processamentos térmicos sobre a tilosina - antibiótico da classe dos macrolídeos - em concentrações residuais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de aquecimento, reproduzindo as condições comerciais de processamento do leite, a fim de verificar se há redução na concentração dos resíduos, bem como a formação de produtos de degradação. A mesma avaliação foi efetuada em soluções padrão aquosas da substância. Um método analítico foi desenvolvido e validado para a determinação de tilosina em leite, baseado em uma extração QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) inovadora e na detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial triplo quadrupolar (LC-MS/MS). O método possibilitou a determinação da tilosina A (principal componente da mistura de tilosinas A, B, C e D produzida por cepas de *Streptomyces fradiae*) e a detecção da tilosina B (segundo maior componente e produto de degradação da tilosina A em condições ácidas). A recuperação global da tilosina A em condições de precisão intermediária foi superior a 89,3%, com desvio padrão relativo inferior a 12% no intervalo de concentração de 25 a 75ng/mL. Os valores de CC α , CC β , limite de detecção e de quantificação foram de 58,35ng/mL, 71,70ng/mL, 0,84ng/mL e 2,79ng/mL, respectivamente. Um espectrômetro de massas por tempo de voo (Triplo-TOF) também foi empregado para fins de elucidação estrutural, permitindo a identificação das tilosinas A, B, C e D e do produto de degradação DMT. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente para a avaliação da estabilidade térmica da tilosina, expressa na forma de porcentagens de degradação. Os resultados mostraram que a tilosina é bastante resistente a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento, tanto em solução aquosa quanto no leite, com uma perda máxima de concentração de 10,8% a 62°C por 30 minutos, 13,31% a 78°C por 30 segundos e 6,47% a 128°C por 4 segundos. A alta estabilidade da tilosina pode representar um significativo aumento do risco à saúde pública, uma vez que os resíduos deste antibiótico permanecem no leite mesmo após os processamentos térmicos comerciais.

Palavras-chave: tilosina, leite, processamento térmico.

ABSTRACT

The likely risk to the public health associated to the presence of antibiotic residues in milk is much discussed in scientific literature. However there are few informations about the effects of thermal processing on tilosin, macrolide class antibiotic, in residual concentrations. The objective of this project was evaluate the effect of different temperatures and heating times, reproducing commercial conditions of milk processing so that to verify if there is reduction in residues concentration as well as in the formation of degradation products. The same evaluation was carried out in aqueous standard solutions of the substance. An analytical method was developed and validated for determination of tilosin in milk, based on an innovative QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) extraction and on detection by high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method has enabled determination of tilosin A (the main component of the mixture of tilosins A, B, C and D produced by strains of *Streptomyces fradiae*) and detection of tilosin B (second major component and degradation product of tilosin A in acid conditions). The overall recovery of tilosin A under intermediary precision conditions was higher than 89,3%, with relative standard deviation lower than 12% over the concentration range from 25 to 75ng/mL. The values of CC α , CC β , detection limit and quantification limit were 58,35ng/mL, 71,70ng/mL, 0,84ng/mL and 2,79ng/mL, respectively. A time-of-flight (TOF) mass spectrometer was also employed for purpose of structural elucidation allowing the identification of tilosins A, B, C and D and other degradation products. The obtained data were statistically treated for the evaluation of heat stability of tilosin expressed in degradation percentages form. The results have showed that tilosin is very resistant to different temperatures and heating times both in aqueous solution as in milk, with maximum loss of 10,8% at 62°C for 30 minutes and 13,31% at 78°C for 30 seconds and 6,47% at 128°C and 4 seconds. The high stability of tilosin can represent a significant rising of risk to the public health since residues of this antibiotic remain in milk even after commercial thermal processing.

Palavras-chave: tylosin, milk, heat treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Consumo de antibióticos nos Estados Unidos no ano de 2013...	28
Figura 2	Estrutura dos antibióticos macrolídeos tilosina A, B, C, D e do metabólito diidrodesmicosina.....	34
Figura 3	Fluxograma do método direto.....	73
Figura 4	Fluxograma do método QuEChERS.....	74
Figura 5	Fluxograma do método QuEChERS com <i>clean-up</i> por d-SPE....	75
Figura 6	Amostras selecionadas para a avaliação da repetibilidade do método.....	78
Figura 7	Leites acondicionados em frascos Nalgene® para transporte.....	84
Figura 8	Trocador de calor de superfície raspada usado na pasteurização rápida e tratamento UAT.....	85
Figura 9	Recipiente em aço inox usado na pasteurização lenta.....	86
Figura 10	Preparo das amostras de leite para avaliação da estabilidade da tilosina.....	87
Figura 11	Perfil de degradação da tilosina A.....	92
Figura 12	Teste de degradação a 80°C por 7h em acetonitrila:água (1:1) com 0,1% de FOA.....	93
Figura 13	Diagrama esquemático do espectrômetro de massas API 5000.	94
Figura 14	Espectro de massa da tilosina A (<i>m/z</i> 916) no modo de aquisição varredura total.....	96
Figura 15	Espectro de massa da tilosina A (<i>m/z</i> 916) no modo de aquisição varredura de íons produtos.....	97
Figura 16	Algumas das possíveis rotas de fragmentação da tilosina A (<i>m/z</i> 916).....	97
Figura 17	Espectro de massa no modo de aquisição varredura de íon precursor (<i>m/z</i> 772.6).....	98
Figura 18	Algumas das possíveis rotas de fragmentação da TA (<i>m/z</i> 916), TB (<i>m/z</i> 772) e TC (<i>m/z</i> 902).....	99

Figura 19	Cromatograma da tilosina A e B.....	101
Figura 20	Cromatograma de amostra de leite contendo espiramicina.....	113
Figura 21	Cromatograma de amostra contendo tilosina.....	114
Figura 22	Cromatograma de amostra branca, apresentando as transições de quantificação e confirmação da tilosina.....	115
Figura 23	Curvas de calibração da avaliação do efeito matriz relativo do método para a tilosina, utilizando-se o método dos mínimos quadrados ponderados, com peso de $1/y$	117
Figura 24	Diagrama de Box & Whisker dos dados agrupados da tilosina...	118
Figura 25	Curvas de calibração no diluente preparadas em quatro dias diferentes para avaliação do intervalo de medição e linear.....	119
Figura 26	Curva de calibração de tilosina na matriz com fortificação no início do procedimento.....	120
Figura 27	Curvas de calibração de tilosina na matriz fortificada no início do procedimento e no diluente.....	121
Figura 28	Curvas de calibração de tilosina na matriz fortificada no final do procedimento e no diluente.....	122
Figura 29	Cromatograma de aduto de tilosina A, B, C e D com metanol obtido no padrão de tilosina.....	132
Figura 30	Estrutura molecular e cromatograma da demicinosiltilosina (DMT) em solução padrão.....	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Resultados da projeção da produção nacional 2012/13 a 2022/23 de leite.....	25
Quadro 2	Antimicrobianos macrolídeos clinicamente mais importantes no mundo.....	31
Quadro 3	Resultado da pesquisa no CPVS-SINDAN do quantitativo de macrolídeos disponíveis para uso em diferentes espécies animais (atualização em 04/01/2014).....	33
Quadro 4	Impurezas conhecidas da tilosina.....	35
Quadro 5	Limites Máximos de Resíduos (LMRs) de antimicrobianos macrolídeos para o leite.....	38
Quadro 6	Resultados dos estudos encontrados no levantamento bibliográfico.....	42
Quadro 7	Resultados do levantamento bibliográfico de Costa (2012), atualizado para 2013.....	44
Quadro 8	pH medido das soluções para teste de degradação da tilosina...	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições cromatográficas do método de detecção de ionóforos poliéteres em leite.....	61
Tabela 2	Programa de eluição gradiente do método de detecção de ionóforos poliéteres em leite.....	62
Tabela 3	Condições iniciais e valores testados para a otimização espectrométrica dos macrolídeos.....	63
Tabela 4	Leites avaliados para verificar a ausência de macrolídeos.....	64
Tabela 5	Composição de sais testados para <i>clean-up</i> por d-SPE.....	66
Tabela 6	Etapas executadas por diferentes operadores na avaliação da precisão intermediária.....	79
Tabela 7	Separação do leite para aplicação dos tratamentos térmicos.....	84
Tabela 8	Valores de DP, CE e CXP para as tilosinas A, B e C.....	99
Tabela 9	Condições cromatográficas do método de separação das tilosinas A, B e C com coluna Polaris® (C-18A, 3 µm, 100 mm x 2 mm)	100
Tabela 10	Programa de eluição gradiente para a separação das tilosinas A, B e C, em coluna Polaris® (C-18A, 3 µm, 100 mm x 2 mm), com fases móveis e demais condições descritas na Tabela 9.....	101
Tabela 11	Programa de eluição gradiente.....	102
Tabela 12	Resultados das condições analíticas do LC-MS/MS.....	104
Tabela 13	Condições cromatográficas do LC-Triplo TOF/MS.....	105
Tabela 14	Programa de eluição gradiente do LC-Triplo TOF/MS.....	105
Tabela 15	Condições espectrométricas do LC-Triplo TOF/MS.....	106
Tabela 16	Resultados do teste realizado pela Agilent para a extração de macrolídeos utilizando-se diferentes composições de sais.....	107
Tabela 17	Valores de pKa dos macrolídeos.....	107
Tabela 18	Resultados dos testes direto, QuEChERS inovador e	109

	QuEChERS inovador com SPE-dispersivo para a extração de macrolídeos em leite.	
Tabela 19	Verificação da resposta da tilosina pelo método escolhido para validação.	111
Tabela 20	Amostras selecionadas para avaliação do efeito matriz relativo.....	116
Tabela 21	Desvios padrão relativos em condições de repetibilidade (RSD _r) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar.....	122
Tabela 22	Repetibilidade e recuperação do método em condições de repetibilidade para a determinação de tilosina em amostras de leite fortificadas.....	123
Tabela 23	Desvios padrão relativos em condições de reprodutibilidade (RSD _R) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar.....	124
Tabela 24	Precisão intermediária e recuperação do método em condições de precisão intermediária para a determinação de tilosina em amostras de leite fortificadas.	124
Tabela 25	Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos.	125
Tabela 26	Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos.	125
Tabela 27	Avaliação da estabilidade da solução estoque de tilosina.....	127
Tabela 28	Resultados obtidos no teste de avaliação da estabilidade da tilosina em solução.....	128
Tabela 29	Concentração média de tilosina encontrada.....	130
Tabela 30	Avaliação dos resultados obtidos no Triplo-TOF.....	133
Tabela 31	Estimativa do aumento ou redução da concentração de tilosina após os processamentos térmicos.....	134
Tabela 32	Razão DMT amostra tratada termicamente/amstra branca.....	135

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABR	Amostra branca
ACBR	Amostra branca de reagentes
ACC	Amostra branca de leite
ACN	Acetonitrila
ACNC	Amostra controle não conforme
ACNCFF	Amostra controle não conforme com fortificação no final
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> , Associação Oficial de Métodos Analíticos.
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> , Ionização química à pressão atmosférica
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CCAA	Comotê Científico para Alimentação Animal
CCRVDF	<i>Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods</i> , Comitê Codex para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos
DHTB	20-diidrodesmicosina
DMFS	Dispersão da matriz em fase sólida
DMT	Demincinosiltosina
DPR	Diferença Percentual Relativa
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Agência Europeia para Avaliação de Medicamentos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EFS	Extração em fase sólida
EFS-d	Extração em fase sólida disoersiva
ELL	Extração líquido-líquido
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , Ionização por eletrospray
ESPI	Espiramicina
ERI	Eritromicina

EU	<i>European Union</i> , União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana para Medicamentos e Alimentos
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FOA	Ácido fórmico
FR1	Fator de resposta 1
FR2	Fator de resposta 2
GC-MS/MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> , Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
GS1	Gás de nebulização
GS2	Gás de secagem
GT	Grupo de trabalho
HTST	<i>High Temperature-Short Time</i>
IDA	Ingestão diária aceitável
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IS	<i>Ions spray voltage</i>
IsoTA	Isotilosina A
IT	<i>Ion trap</i> , Armadilha de íons
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> , Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes
LACT	Lactenocina
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> , Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LMR	Limites máximos de resíduos

LTLT	<i>Low Temperature- Long Time</i>
MACs	Macrolídeos
MMQP	Método dos mínimos quadrados ponderados
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MECN	Acetonitrila tamponada
MeOH	Metanol
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MRC	Material de referência certificado
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Monitoramento de Reações Múltiplas
MRSA	<i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
MS	Ministério da Saúde
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i> , Organização Mundial para a Saúde Animal
OLE	Oleandomicina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMT	5-O-micaminosiltilonólídeo
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PCRL	Programa de Controle de Resíduos em Leite
PLE	<i>Pressurized Liquid Extraction</i> , Extração com líquido pressurizado
PI	Padrão interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
POP	Procedimento Operacional Padrão
PSA	Amina primária e secundária
Q _{IT}	Quadrupolo-armadilha de íons
Q _{IT} TOF	Quadrupolo-armadilha de íons-tempo de voo
QqQ	Triplo quadrupolo
QqQ _{LIT}	Triplo quadrupolo-armadilha de íons linear
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged e safe</i> , Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro.
ROXI	Roxitromicina

RSD	Desvio padrão relativo
TAD	Tilosina A aldol
TFA	Ácido trifluoroacético
TIL	Tilosina
TOF	<i>Time of light</i> , Tempo de voo
t _R	Tempo de retenção
TROL	Troleandomicina
UAT	Ultra-alta temperatura
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance.
UV-DAD	Ultravioleta-Arranjo de diodos
UV-Vis	Ultravioleta visível
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1	PRODUÇÃO E CONSUMO DE LEITE.....	24
1.2	MASTITE BOVINA: CONTROLE E IMPACTOS NA PRODUÇÃO LEITEIRA.....	25
1.3	RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	26
1.4	VIGILÂNCIA SANITÁRIA E RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS.....	28
1.5	MACROLÍDEOS: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MECANISMO DE AÇÃO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	30
1.6	IMPLICAÇÕES DO USO DE MACROLÍDEOS SOBRE A QUESTÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	31
1.7	TILOSINA.....	33
1.8	PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E IMPUREZAS DA TILOSINA.....	34
1.9	ASPECTOS REGULATÓRIOS.....	36
1.10	PROCESSAMENTO TÉRMICO DO LEITE.....	39
1.11	ESTADO DA ARTE A RESPEITO DO IMPACTO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO SOBRE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE.....	41
1.12	ESTADO DA ARTE A RESPEITO A RESPEITO DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE.....	43
1.13	USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MACROLÍDEOS, PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E IMPUREZAS.....	45
1.14	TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE.....	47

1.15	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS.....	49
1.15.1	Seletividade.....	50
1.15.2	Efeito matriz (relativo e absoluto).....	51
1.15.3	Intervalo de medição e intervalo linear instrumental.....	51
1.15.4	Linearidade (intervalo linear do método).....	51
1.15.5	Sensibilidade.....	52
1.15.6	Limite de detecção (LOD)	52
1.15.7	Limite de quantificação (LOQ)	52
1.15.8	Limite de decisão ($CC\alpha$)	53
1.15.9	Capacidade de detecção ($CC\beta$)	53
1.15.10	Exatidão	53
1.15.11	Veracidade.....	54
1.15.12	Recuperação.....	54
1.15.13	Precisão.....	54
1.15.13.1	<i>Repetibilidade de medição</i>	54
1.15.13.2	<i>Precisão intermediária de medição</i>	55
1.15.14	Estabilidade do analito.....	55
2	OBJETIVOS	56
2.1	OBJETIVO GERAL.....	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
3	METODOLOGIA	57
3.1	MATERIAIS.....	57
3.1.1	Padrões.....	57
3.1.2	Reagentes e solventes.....	57
3.1.3	Equipamentos e acessórios.....	58
3.2	PROCEDIMENTOS.....	59
3.2.1	Preparo das soluções-estoque.....	59
3.2.2	Testes de degradação da tilosina A.....	60
3.2.3	Otimização	60
3.2.4	Estudos de desenvolvimento de um método cromatográfico e espectrométrico para a separação e detecção das tilosinas A, B, C	61

	e D e para os macrolídeos incluídos no estudo de seletividade do método validado.	
3.2.5	Condições cromatográficas e espectrométricas desenvolvidas no Triplo-TOF	63
3.2.6	Obtenção e armazenamento de amostras.....	63
3.2.7	Procedimentos de extração/purificação testados.....	65
3.2.7.1	<i>Soluções padrão em acetonitrila:água (1:3, v/v) para fortificação do leite.....</i>	66
3.2.7.2	<i>Preparo de amostras brancas de reagentes (ACBR).....</i>	67
3.2.7.3	<i>Preparo de amostras brancas de leite (ACC).....</i>	69
3.2.7.4	<i>Amostras fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,125 LMR/ 0,5 LQ a 3 LMR/ 4 LQ para os métodos direto e QuEChERS com e sem clean-up por d-SPE.....</i>	69
3.2.7.5	<i>Preparo das soluções de fortificação no final do procedimento.....</i>	70
3.2.7.6	<i>Amostras fortificadas no final do procedimento para os métodos direto e QuEChERS com e sem clean-up por d-SPE.....</i>	72
3.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SELECIONADO.....	76
3.3.1	Seletividade.....	76
3.3.2	Intervalo de medição e linear (função de calibração) instrumental...	76
3.3.3	Linearidade, sensibilidade e efeito matriz absoluto.....	77
3.3.4	Repetibilidade.....	77
3.3.5	Precisão intermediária.....	79
3.3.6	Recuperação e eficiência da extração/purificação.....	79
3.3.6.1	<i>Recuperação.....</i>	79
3.3.6.2	<i>Eficiência da extração.....</i>	80
3.3.7	Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β).....	81
3.3.8	Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	81
3.3.8.1	<i>Limite de detecção (LOD).....</i>	81
3.3.8.2	<i>Limite de quantificação (LOQ).....</i>	81
3.3.9	Estabilidade do analito.....	82
3.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA TILOSINA EM SOLUÇÃO E EM LEITES TERMICAMENTE PROCESSADOS.....	82

3.4.1	Preparo da solução padrão de tilosina para os tratamentos térmicos	82
3.4.2	Tratamento térmico da solução padrão de tilosina.....	83
3.4.3	Aquisição das amostras de leite.....	83
3.4.4	Fortificação da amostra de leite.....	84
3.4.5	Processamentos térmicos efetuados no leite.....	85
3.4.6	Análise das soluções padrão de tilosina.....	86
3.4.7	Preparo das amostras para quantificação pelo método validado.....	87
3.4.8	Procedimentos para a avaliação dos resultados dos testes de estabilidade da tilosina em leites termicamente processados.....	88
3.4.8.1	<i>Teste de Grubbs</i>	89
3.4.8.2	<i>Teste de Shapiro-Wilk</i>	90
3.4.8.3	<i>Teste t (Student)</i>	91
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.1	Testes de degradação da tilosina A.....	92
4.2	Otimização	94
4.3	Condições cromatográficas e espectrométricas desenvolvidas.....	100
4.3.1	Método cromatográfico para separação da tilosinas A, B e C.....	100
4.3.2	Método cromatográfico e espectrométrico para as tilosinas A, B e C e os outros macrolídeos incluídos no estudo da seletividade do método validado.....	102
4.3.3	Método cromatográfico e espectrométrico desenvolvido no LC-Triplo TOF/MS	105
4.4	Procedimentos de extração/purificação testados.....	106
4.5	Validação.....	112
4.5.1	Seletividade (incluindo o efeito matriz relativo).....	112
4.5.2	Intervalo de medição e intervalo linear.....	117
4.5.3	Linearidade, sensibilidade e efeito matriz absoluto.....	119
4.5.4	Repetibilidade, precisão intermediária, recuperação e eficiência da extração/purificação.....	122
4.5.5	Limite de detecção (LOD)	126
4.5.6	Limite de quantificação (LOQ)	126
4.5.7	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	126

4.5.8	Estabilidade do analito.....	126
4.6	Aplicação do método validado para a avaliação da estabilidade da tilosina em solução e em leites termicamente processados.....	127
4.6.1	Avaliação da estabilidade da tilosina em solução.....	127
4.6.2	Avaliação da estabilidade da tilosina em leites termicamente processados.....	129
4.7	Avaliação dos padrões e amostras analisadas por LC-Triplo TOF/MS.....	131
5	CONCLUSÃO.....	136
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139
	REFERÊNCIAS.....	140

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE LEITE

A preocupação com a segurança alimentar, especialmente em relação aos perigos químicos, tem aumentado nos últimos anos. O crescimento do mercado de alimentos, o avanço dos meios de comunicação e o aumento da mobilidade das populações têm contribuído para a elevação dos perfis e significados da segurança alimentar e da regulação dos alimentos. Por exigência do mercado consumidor, o atual comércio internacional de alimentos desempenha um papel cada vez maior no fornecimento de produtos que contribuam, simultaneamente, para uma dieta variada e com qualidade sanitária (ROSA, 2012).

O leite é considerado o mais completo alimento e possui elevado valor biológico na alimentação humana. Por ser uma das mais importantes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais, principalmente para jovens, idosos e convalescentes, apresenta-se como prioridade para vários programas de controle. Portanto, do ponto de vista da saúde pública, o leite ocupa posição de destaque na nutrição humana (GERMANO; GERMANO, 2011).

A indústria láctea representa uma atividade que tem impacto sócio-econômico significativo, pois a produção e o consumo do leite e de seus derivados têm crescido no Brasil e em muitos países em desenvolvimento (BELTRANE; JUNIOR, 2005). Mesmo não sendo autosuficiente, o Brasil é o quinto maior produtor mundial do produto, sendo os Estados Unidos o primeiro colocado no *ranking* mundial de produção (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012). De acordo com os dados da Projeção do Agronegócio Brasileiro 2012/2013 a 2022/2023 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (quadro 1), o leite foi considerado um dos produtos que apresentam elevadas possibilidades de crescimento com uma taxa anual de 1,9%. A produção de leite cru deve chegar a 41,304 milhões de litros em 2023, e o consumo projetado para este ano deve crescer 16,82% em relação a 2013 chegando a 42,398 milhões de litros, o que exigirá certo volume de importações (BRASIL, 2013).

Quadro 1 - Resultados da projeção da produção nacional 2012/13 a 2022/23 de leite.

Produto	Ano	Produção (Milhões de Litros)	Consumo (Milhões de Litros)
Leite	2013	34,230	35,266
	2014	35,017	36,030
	2015	35,747	36,756
	2016	36,464	37,469
	2017	37,151	38,176
	2018	37,845	38,881
	2019	38,538	39,584
	2020	39,229	40,288
	2021	39,921	40,991
	2022	40,612	41,695
	2023	41,304	42,398

Fonte: Adaptado da Projeção do Agronegócio Brasileiro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

Para assegurar a produtividade e a competitividade dos produtos lácteos é comum o uso de medicamentos veterinários com fins terapêuticos e/ou profiláticos. Dentre os medicamentos utilizados, os agentes antimicrobianos estão entre as classes mais prescritas. Por isso, o monitoramento de seus resíduos em alimentos é uma preocupação crescente devido ao seu potencial impacto na saúde humana (ROSA, 2012).

1.2 MASTITE BOVINA: CONTROLE E IMPACTOS NA PRODUÇÃO LEITEIRA

Dentre as várias patologias que acometem o rebanho leiteiro mundial, a mastite bovina, uma inflamação da glândula mamária, pode ser considerada a mais comum e a mais onerosa para a exploração de animais de interesse zootécnico destinados à produção de leite, sendo, por isso, fundamental a prevenção, o controle e o tratamento dessa doença. Os prejuízos devem-se, principalmente, ao descarte do leite em consequência das alterações de sua composição e/ou pela presença de resíduos de antibióticos após o tratamento; à queda da produção total de leite; e aos

gastos com antibióticos no tratamento dos animais acometidos. A doença causa ainda sofrimento ao animal, além dos efeitos negativos sobre a qualidade do leite e derivados lácteos, tais como a redução dos teores de cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento de sódio e cloro (CHAGUNDA e col., 2006; DUARTE, 2010; PERES; ZAPPA, 2011; PILON; TOZZETTI e col., 2008).

Os fatores que afetam a incidência e a etiologia da mastite são o clima, a variação sazonal, a densidade populacional animal e o manejo (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2012). A doença pode ser classificada quanto à sua etiologia como de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa, sendo as causas infecciosas as de maior incidência, com destaque para as infecções bacterianas, embora fungos, algas e vírus possam também estar envolvidos no desenvolvimento da doença. Dentre os micro-organismos bacterianos predominam o *Staphylococcus sp* e o *Streptococcus sp*, responsáveis por cerca de 90 a 95% de todas as infecções dos rebanhos leiteiros. Para o controle da mastite, o uso de antimicrobianos por via intramamária ou sistêmica continua sendo a principal estratégia utilizada (PERES; ZAPPA, 2011).

1.3 RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NA MEDICINA VETERINÁRIA

A higiene dos alimentos de origem animal inicia-se nas propriedades de exploração zootécnica. Nesses locais, os rebanhos ou lotes de animais devem ser submetidos a condições de nutrição e manejo que possibilitem um nível de saúde elevado, contribuindo para a produção de alimentos seguros tanto no aspecto químico quanto microbiológico (GERMANO; GERMANO, 2011).

O amplo uso de agentes antimicrobianos em animais produtores de alimentos para aumentar a taxa de ganho de peso e melhorar a eficiência alimentar (utilizados como promotores de crescimento) e para tratar e/ou prevenir enfermidades (aplicação terapêutica e profilática, respectivamente) podem provocar agravos à saúde devido à presença de seus resíduos em alimentos (TONG e col., 2009). Para evitar a presença de resíduos nos produtos de origem animal em concentrações nocivas à saúde humana, é necessário respeitar o período de carência, que deve ser indicado na bula, e que varia de acordo com o produto utilizado. Geralmente,

produtos para vacas em lactação apresentam menor período de carência do que os produtos para vacas em período não lactante, os quais são desenvolvidos para permanecerem por algumas semanas no úbere (JÚNIOR, 2004).

A exposição prolongada a estes resíduos pela ingestão em pequenas quantidades através dos alimentos pode levar a efeitos indesejáveis diretos ou indiretos em humanos. Os efeitos diretos podem manifestar-se como:

- Alérgicos: sintomas alérgicos em indivíduos hipersensíveis;
- Citotóxicos: imunopatológicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e toxicidade para a medula óssea;
- Genotóxicos: carcinogenicidade e mutagenicidade;
- Desordens reprodutivas.

Os efeitos indiretos são igualmente importantes e manifestam-se como:

- Desenvolvimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos usados na terapia humana (BURKIN; GALVIDIS, 2012; NISHA, 2008).

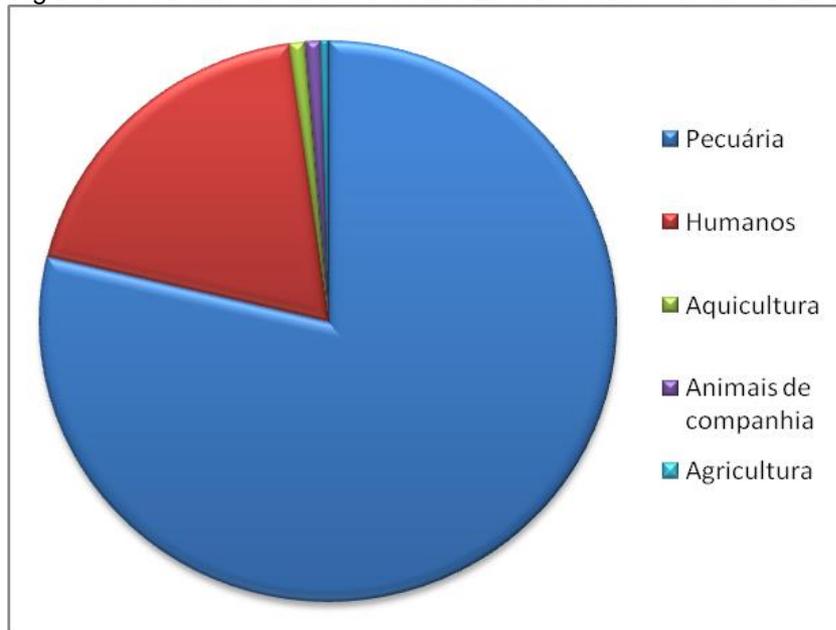
O emprego de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento está em discussão devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana a antimicrobianos e seu impacto na medicina humana. Em reunião conjunta entre as entidades internacionais, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization, FAO*), a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization, WHO*) e a Organização Mundial de Saúde Animal (*Office International des Épizoties, OIE*) reportaram que o uso dessas substâncias em subdoses pode criar condições favoráveis ao surgimento, persistência e difusão de micro-organismos antibiótico-resistentes (FAO, 2012).

A resistência a antimicrobianos é uma consequência inevitável da adaptação evolutiva de micro-organismos, porém, o uso dessas substâncias nas práticas veterinárias tem contribuído significativamente para o rápido aumento da resistência entre micro-organismos patogênicos e comensais. Especula-se que o uso de antimicrobianos na agropecuária é o principal fator desencadeador da resistência por várias evidências: o amplo uso de agentes antimicrobianos na produção animal, incluindo o uso como aditivos na ração, para suprir o mercado com produtos de origem animal para consumo humano; o uso de drogas com mesmo mecanismo de ação daquelas disponíveis para uso na medicina humana, resultando na exposição humana a patógenos resistentes a antimicrobianos através dos alimentos e também

devido à liberação generalizada dessas substâncias no ambiente (SILBERGELD e col., 2008).

Devido à pouca regulamentação e fiscalização do uso não humano de antibióticos no mundo, a resistência bacteriana tem se tornado um sério problema de Saúde Pública. Segundo um levantamento de dados efetuado em 2013 sobre o uso de antibióticos nos Estados Unidos, são consumidos diariamente neste país cerca de uma tonelada de antibióticos, destes, 80% são destinados somente à agricultura (Figura 1) contribuindo fortemente para a pressão seletiva a favor dos micro-organismos resistentes. Por estes motivos, várias entidades internacionais têm alertado para a tomada de medidas a fim de retardar a disseminação de micro-organismos resistentes a antimicrobianos (HOLLIS, A; AHMED, Z., 2013).

Figura 1: Consumo de antibióticos nos Estados Unidos no ano de 2013.



Fonte: Adaptado de HOLLIS, A.; AHMED, Z. (2013).

1.4 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS

No Brasil, a garantia das ações de Vigilância Sanitária de alimentos é compartilhada entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a ANVISA, órgão competente do Ministério da Saúde.

A ANVISA, frente à questão da presença de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos e a sua relação com a resistência bacteriana promoveu, no ano de 2000, um fórum de discussão, com a participação de representantes do governo e da sociedade civil, que culminou em uma proposta de ação de vigilância sanitária denominada “Medicamentos Veterinários x Saúde Pública”. Essa proposta continha duas linhas básicas de monitoramento: resíduos em alimentos e resistência bacteriana (RDC nº5 de 24 de janeiro de 2000). A preocupação daquele fórum com o uso de medicamentos veterinários em animais de produção, cujos resíduos nos alimentos poderiam significar risco à saúde pública motivou o início do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal (PAMVet) em 2002, cujo objetivo geral é “*subsidiar a análise de risco do uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos visando fortalecer os mecanismos de controle sanitário.*” O Programa foi instituído, oficialmente, pela Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, onde a primeira matriz de análise foi o leite, por se constituir em uma importante fonte de nutrientes para a população brasileira, principalmente crianças e idosos.

Outro programa federal de fiscalização e monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos também está em vigor, o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, instituído pela Instrução Normativa SDA nº42 de 20 de dezembro de 1999, cujos objetivos são: “(1) *conhecer o potencial de exposição da população aos resíduos nocivos à saúde do consumidor, parâmetro orientador para a adoção de políticas nacionais de saúde animal e fiscalização sanitária e (2) impedir o abate para consumo de animais oriundos de criatórios onde se tenha constatado violação aos LMR e, sobretudo, ao uso de drogas veterinárias proibidas no território nacional*”.

Além dessas ações, um controle rigoroso dos medicamentos de uso veterinário é necessário para garantir a segurança dos alimentos de origem animal devido aos possíveis riscos à saúde humana decorrentes do crescente uso destas substâncias na produção animal. Estes medicamentos também devem ser regulamentados por diretrizes adequadas a fim de assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

Assim sendo, todas estas ações são de fundamental importância tanto para a questão da resistência bacteriana quanto para o conhecimento da exposição da

população aos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

1.5 MACROLÍDEOS: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MECANISMO DE AÇÃO E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Antibióticos macrolídeos são um grupo de compostos ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, produzidos por vários organismos do gênero *Streptomyces* e cujas moléculas caracterizam-se por uma estrutura química comum, o anel lactona macrocíclico contendo 14, 15 ou 16 átomos de carbono, com moléculas de açúcares (desosamina, cladinose, micaminose, micarose e micosamina) ligadas por ligações glicosídicas (KANFER e col., 1998; SISMOTTO e col., 2013).

Os macrolídeos classificam-se em grupos de acordo com o número de átomos de carbono do anel lactona:

- Grupo de 14 carbonos: eritromicina, roxitromicina e claritromicina;
- Grupo de 15 carbonos: azitromicina;
- Grupo de 16 carbonos: espiramicina, josamicina, tilmicosina e tilosina.

Quimicamente, os macrolídeos apresentam em geral pKa entre 7,1 e 9,9 e alguns são sensíveis ao pH baixo sofrendo degradação em condições ácidas (SISMOTTO e col., 2013).

Dentro da ampla gama de drogas antimicrobianas permitidas para uso nos animais produtores de alimentos, essa classe destaca-se como uma das mais usadas. O emprego desses agentes na medicina humana e veterinária varia entre os países. O quadro 2 apresenta os antimicrobianos clinicamente mais importantes da classe dos macrolídeos nos diversos países e regiões (BURKIN; GALVIDIS, 2012; GUARDABASSI e col., 2010; SILBERGELD, 2008).

Quadro 2 - Antimicrobianos macrolídeos clinicamente mais importantes no mundo.

País	Macrolídeos
Austrália	Kitasamicina Oleandomicina Tilosina
União Europeia	Tilosina Espiramicina
Canadá	Eritromicina Tilosina
Estados Unidos	Eritromicina Oleandomicina Tilosina Tiamulina

Fonte: Adaptado de Silbergeld e col., 2008.

Atualmente no Brasil os antibióticos macrolídeos estão disponíveis para o tratamento de diversas infecções bacterianas agudas e crônicas em animais e também como aditivos alimentares. Os macrolídeos mais comumente usados para fins terapêuticos são: eritromicina, espiramicina e tilosina, sendo estas duas últimas usadas exclusivamente na medicina veterinária (SPISSO e col., 2010).

Em geral, os macrolídeos atuam inibindo a síntese proteica por ligação ao ribossomo 50S bacteriano, impedindo assim a tradução de polipeptídeos (HAMSCHEER, 2006; SOUTO, 1998).

Quanto aos aspectos toxicológicos, ainda são escassos os dados disponíveis publicamente na literatura científica em relação aos macrolídeos, porém existem relatos da ocorrência de distúrbios gastro-intestinais, reações de hipersensibilidade e inibição do metabolismo hepático. Ainda assim, não há evidências de efeitos tóxicos mais graves devido ao uso de antibióticos macrolídeos (SPISSO e col., 2010).

1.6 IMPLICAÇÕES DO USO DE MACROLÍDEOS SOBRE A QUESTÃO DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

Frente à situação preocupante da resistência bacteriana a antimicrobianos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) priorizou a classe dos macrolídeos como

uma das três principais para o desenvolvimento de estratégias de gestão de risco a fim de preservar sua eficácia na medicina humana, já que a resistência pode emergir em patógenos zoonóticos como *Campylobacter spp* e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). A OIE considera alguns macrolídeos, como a eritromicina, espiramicina, tilmicosina e tilosina, como antimicrobianos criticamente importantes na medicina veterinária já que existem poucos tratamentos alternativos para algumas doenças que acometem bovinos, suínos e aves (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2007).

Atenta a este cenário, a União Europeia (EU) vem ao longo dos anos proibindo o uso de antibióticos como promotores de crescimento a fim de reduzir o volume disponível dessas substâncias para esta finalidade. Em 1998, após consulta ao Comitê Científico para a Alimentação Animal (CCAA), a UE reconheceu que a vasta utilização de macrolídeos na alimentação animal contribuiria, a longo prazo, para a seleção de micro-organismos resistentes e sua provável transferência para o homem ou dos seus genes da resistência. Portanto, para proteger a saúde humana, a UE decidiu retirar a autorização dos antibióticos macrolídeos tilosina e espiramicina para uso como promotores de crescimento (UNIÃO EUROPEIA, 1998).

O MAPA instituiu no ano de 2003 um grupo de trabalho (GT) para analisar e reavaliar o uso de antimicrobianos como aditivos e seus reflexos na Saúde Pública. Nesta ocasião, os macrolídeos tilosina e espiramicina, entre outras poucas moléculas, foram especialmente analisados. Em relação ao uso da tilosina e da espiramicina, o GT concluiu que os dados relativos à toxicidade dessas substâncias não são relevantes do ponto de vista da decisão da continuidade ou não do uso desta molécula como aditivo promotor de crescimento sob a premissa de que o potencial de risco ainda não está dimensionado e quantificado e que a retirada dessas substâncias implicará em perda relevante de eficiência produtiva e consequente prejuízo da produção animal em nosso país (BRASIL, 2003). Entretanto, após nove anos o MAPA, através da Instrução Normativa nº 14 de 2012, proibiu a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho (MAPA, 2012). A tilosina segue até então permitida para esta mesma finalidade no Brasil, além do emprego terapêutico nos produtos de uso veterinário.

1.7 TILOSINA

Uma pesquisa realizada no Compêndio de Produtos Veterinários revelou que os antibióticos macrolídeos estão disponíveis para o tratamento de uma ampla gama de infecções bacterianas agudas e crônicas (quadro 3).

Quadro 3: Resultado da pesquisa no CPVS-SINDAN do quantitativo de macrolídeos disponíveis para uso em diferentes espécies animais (atualização em 04/01/2014).

ESPÉCIE ANIMAL	MACROLÍDEOS			
	Tilosina	Tilmicosina	Josamicina	Espiramicina
Bovinos	7	1	0	4
Aves	3	1	1	0
Ovinos	4	0	0	0
Caprinos	6	0	0	0
Suínos	11	2	0	0
Caninos	0	0	0	4
Felinos	0	0	0	4
Equinos	0	0	0	0
TOTAL	31	4	1	12

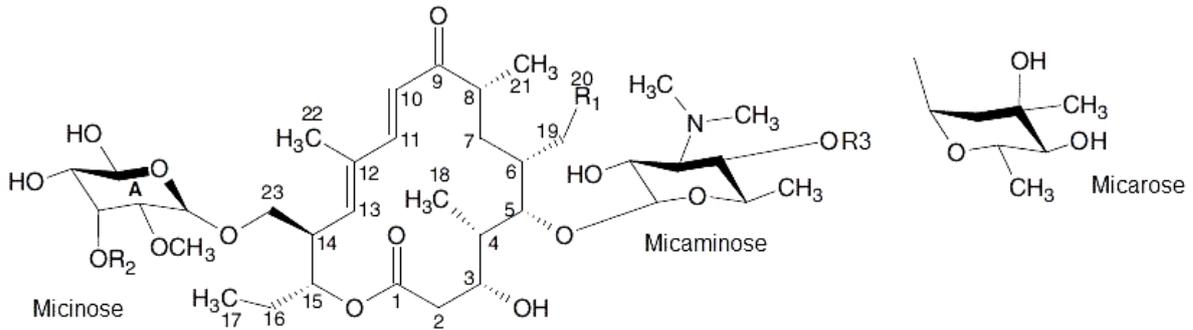
Nesta classe de antibióticos, tem sido observado um predomínio de tilosina nas formulações dos medicamentos indicados para o tratamento da mastite bovina no mercado brasileiro (CPVS-SINDAN, 2013).

A tilosina - nº no Chemical Abstract Service (CAS) 1401-69-0, fórmula molecular $C_{46}H_{77}NO_{17}$ e massa molar 916,0g/mol - é um antibiótico macrolídeo frequentemente usado na medicina veterinária para o tratamento da mastite e que possui atividade contra organismos gram-positivos e gram-negativos. Sua composição é caracterizada por um anel lactona com 16 membros e três amino/neutro açúcares (micaminose, micinose e micarose) que dão à molécula um caráter básico.

A tilosina constitui-se de uma mistura de quatro antibióticos macrolídeos produzidos por cepas de *Streptomyces fradiae*. O principal componente da mistura é a tilosina A (mais de 80%), embora as tilosinas B (desmicosina), C (macrocin) e D (relomicina) possam também estar presentes em quantidades variáveis dependendo da fabricação (Figura 2). A atividade antimicrobiana se deve principalmente à tilosina

A, enquanto as tilosinas B, C, D e a diidrodesmicosina (um metabólito) apresentam cerca de 83%, 75%, 35% e 31% da atividade da tilosina A, respectivamente (WHO, 2008; CHOPRA e col., 2013).

Figura 2 - Estrutura dos antibióticos macrolídeos tilosina A, B, C, D e do metabólito diidrodesmicosina.



	Fórmula Molecular	R₁	R₂	R₃	Anel Lactona
Tilosina A	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	CHO	CH ₃	Micarose	Presente
Tilosina B	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	CHO	CH ₃	H	Presente
Tilosina C	C ₄₅ H ₇₅ NO ₁₇	CHO	H	Micarose	Presente
Tilosina D	C ₄₆ H ₇₉ NO ₁₇	CH ₂ OH	CH ₃	Micarose	Presente
Diidrodesmicosina	C ₃₉ H ₆₇ NO ₁₄	CH ₂ OH	CH ₃	H	Presente

Fonte: Adaptado de Ashenafi e col., 2011.

A tilosina, por ser uma base fraca lipofílica, passa rapidamente do plasma sanguíneo para o leite, podendo deixar resíduos neste fluido e nos tecidos animais comestíveis e causar efeitos indesejáveis à saúde do consumidor, como o aparecimento de alergias em indivíduos com hipersensibilidade e desenvolvimento de bactérias antibiótico-resistentes (JUAN e col., 2010; WHO, 2008). Esta última é a principal preocupação em relação ao uso da tilosina e demais macrolídeos.

1.8 PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E IMPUREZAS DA TILOSINA

Poucos estudos têm sido realizados a fim de caracterizar impurezas, produtos de biotransformação e de degradação da tilosina. No entanto, a determinação do

conteúdo, a identificação de impurezas desconhecidas e o estabelecimento de limites apropriados para estas substâncias são importantes parâmetros que ajudam a avaliar a qualidade de uma droga, e conseqüentemente os possíveis riscos associados ao seu uso em animais produtores de alimentos. Chopra e colaboradores realizaram em 2013 a caracterização de impurezas da tilosina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, com analisador do tipo quadrupolo-armadilha de íons (*ion trap*) (QIT). Através desta técnica foi possível separar os quatro principais componentes da tilosina (tilosina A, B, C e D) além de vinte e três outras impurezas até então desconhecidas (quadro 4). Além destas, várias substâncias relacionadas formadas durante a produção da tilosina por fermentação foram elucidadas, dentre elas a 5-O-micaminosiltilonólídeo (OMT), demicinosiltilosina (DMT), lactenocina (LACT), 20-diidrodesmicosina (DHTB), tilosina A aldol (TAD) e isotilosina A (IsoTA). A TAD é formada a partir da tilosina A em soluções neutras e alcalinas, enquanto a isoTA é um produto da fotodegradação formado a partir da exposição de solução de tilosina A à luz (CHOPRA e col., 2013).

Quadro 4: Impurezas conhecidas da tilosina.

Impureza	m/z
OMT	598
DMT	742
Isômero da tilosina B	772
LACT	758
Isômero da tilosina C	902
DHTB	774
TB	772
Isômero da tilosina A	916
Tilosina C	902
TAD	916
Tilosina D	918
Tilosina A	916
IsoTA	916
Isômero da tilosina D	918

Fonte: Adaptado de CHOPRA e col (2013).

Segundo estudos em ratos para a coleta de dados bioquímicos, os principais compostos derivados da biotransformação hepática da tilosina são a tilosina A, a tilosina D (relomicina) e a diidrodesmicosina (WHO, 2008). Em condições ácidas, a tilosina A degrada-se gradualmente à tilosina B e, apesar da tilosina A ser considerada o resíduo marcador, a presença dos outros tipos de tilosina pode levar a uma diferença de 15% na quantificação de seus resíduos totais (SISMOTTO e col., 2013). Além disso, o fato da tilosina e alguns dos seus produtos de degradação apresentar atividade biológica demonstra a importância do monitoramento dessas substâncias nos alimentos.

1.9 ASPECTOS REGULATÓRIOS

Órgãos internacionais de saúde pública, liderados pela OMS, têm mostrado, ao longo das últimas décadas, preocupação cada vez maior com a qualidade dos alimentos e suas possíveis repercussões na saúde dos consumidores, como também com o comércio mundial de produtos alimentícios, sejam *in natura* ou industrializados (GERMANO; GERMANO, 2011).

Considerando que a contaminação do leite por agentes químicos, incluindo os resíduos de antimicrobianos, pode se constituir em um problema de Saúde Pública, caso as Boas Práticas Veterinárias não sejam obedecidas, o MAPA, através da Instrução Normativa nº 62 de 2011, regula o envio de leite de animais tratados com medicamentos de uso veterinário em geral a estabelecimentos industriais para beneficiamento, exigindo a pesquisa periódica de resíduos (BRASIL, 2011).

Além dessas medidas, a fim de possibilitar a garantia da inocuidade dos alimentos e, conseqüentemente, a proteção da saúde dos consumidores no âmbito mundial e, ao mesmo tempo, zelar pela aplicação de práticas leais no comércio de alimentos, um grupo de especialistas de vários países é periodicamente convocado pela FAO/WHO para discutir questões relacionadas à segurança dos resíduos dos medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. Este grupo de especialistas, conhecido como *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) efetua as avaliações de risco e recomenda valores de ingestão diária aceitável (IDA) e limites máximos de resíduos (LMR) para cada substância candidata quando administrada em animais produtores de alimentos de acordo com as Boas Práticas

Veterinárias. Essas recomendações são encaminhadas ao comitê do *Codex Alimentarius* sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários (*Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food*, CCRVDF) que estabelece os Limites Máximos de Resíduos (LMR) *Codex Alimentarius*, a fim de harmonizar os acordos comerciais multilaterais na determinação do nível de proteção sanitária pelos países participantes (FAO/WHO, 2006).

O Brasil, como membro efetivo da FAO, do *Codex Alimentarius* e signatário da OIE, tem participado ativamente das discussões ligadas ao uso de antimicrobianos, incorporando em suas ações as recomendações que considera pertinentes. Diversas autoridades regulatórias, tais como a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA), a Agência para Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) e, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) têm regulamentado níveis aceitáveis de resíduos nos alimentos, ou seja, os Limites Máximos de Resíduos (LMR). Entende-se como LMR a concentração máxima (expressa em mg/Kg, µg/Kg, mg/L ou µg/L) permitida legalmente ou reconhecidamente admissível em um alimento (BRASIL, 2006).

O quadro 5 apresenta os LMR em leite de antimicrobianos macrolídeos instituídos por diversas organizações, países ou regiões. É importante destacar que diferentes valores de LMR foram estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, União Europeia (UE), Estados Unidos (EUA), Argentina, Austrália, Japão e Taiwan. Observa-se que o valor de LMR para a tilosina recomendado pelo Codex e adotado pela Argentina, 100 µg/kg, é o dobro do estabelecido pelos demais países, 50 µg/kg, o que se deve às diferentes avaliações de risco empregadas. Durante o processo de avaliação de risco, valores de ingestão diária aceitável (IDA) são calculados para cada substância. Para a tilosina, a IDA estimada pelo JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*), que subsidia o Codex, é cinco vezes maior do que a estimada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*), esclarecendo a diferença numérica de valores de LMR estabelecidos por estas organizações. A Comunidade Europeia aguarda ainda uma proposta de projeto de LMR Codex para a tilosina no leite incluindo a avaliação de dados toxicológicos, já que o atual valor baseia-se em testes de susceptibilidade microbiana e não na toxicidade da substância (CODEX, 2009).

Quadro 5 - Limites Máximos de Resíduos (LMRs) de antimicrobianos macrolídeos para o leite.

Análito	LMR (µg/Kg)							
	Brasil	UE	EUA	CODEX	Argentina	Austrália	Japão	Taiwan
Eritromicina	40*	40	-	-	40	40	40	40
Espiramicina	-	200	-	200	-	-	-	200
Tilosina	-	50	50	100	100	50	50	50
Tilmicosina	-	50	-	-	-	25 (T)**	50	-
Claritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-
Josamicina	-	-	-	-	-	-	-	-
Oleandomicina	-	-	-	-	-	-	50	-
Troleandomicina	-	-	-	-	-	-	-	-
Roxitromicina	-	-	-	-	-	-	-	-
Diritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-
Azitromicina	-	-	-	-	-	-	-	-

* Referência do MERCOSUL.

** LMR temporário.

Caso os LMRs de alguns antimicrobianos ainda não tenham sido estabelecidos no Brasil, adotam-se aqueles internalizados no Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas diretivas da Comissão Europeia e/ou os utilizados pelo FDA (SISMOTTO e col., 2013; PACHECO-SILVA e col., 2014).

Outras ferramentas de controle dos alimentos são a inspeção e os programas de monitoramento de produtos no comércio e na indústria, onde o critério utilizado leva em conta o risco à saúde do consumidor. Estas últimas são ações de Vigilância Sanitária de abrangência nacional, imediatas, voltadas para coibir ou prevenir riscos advindos de produtos ou práticas que possam trazer prejuízos à saúde da população. No Brasil, para verificar o atendimento aos LMR de medicamentos veterinários em alimentos, dois programas nacionais estão em vigor, um no âmbito do MAPA, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), onde está inserido o Programa de Controle de Resíduos em Leite (PCRL), que tem como objetivo garantir a produção e a produtividade do leite no território nacional, bem como o aporte de produtos similares importados (BRASIL, 2008); e outro no âmbito da ANVISA, o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Este último tem por objetivo operacionalizar a competência legal da Agência de controlar e

fiscalizar resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, tendo como primeira matriz de análise o leite. Esse programa complementa as ações já desenvolvidas pelo MAPA, no setor primário, pois avalia o produto tal como este é apresentado para o consumidor (BRASIL, 2006).

Em 2013, foi publicada a Instrução Normativa nº17, pelo MAPA, que aprovou o escopo analítico para o monitoramento de produtos de origem animal (leite, carnes, pescado, ovos, mel e avestruzes) neste ano (BRASIL, 2013). A tilosina não constou no escopo analítico do PNCR/Leite, desde o primeiro exercício, em 2006, até o último publicado em 2013, e dentre os macrolídeos somente a eritromicina foi incluída no PAMVet até o momento.

1.10 PROCESSAMENTO TÉRMICO DO LEITE

O leite, assim como a maioria dos produtos de origem animal, é altamente perecível. Os elementos nutricionais, sobretudo proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, tornam o leite um excelente substrato para o crescimento de micro-organismos (GERMANO; GERMANO, 2011).

No Brasil, a indústria de laticínios apresenta elevado nível de desenvolvimento tecnológico. Diversos processos estão disponíveis para garantir o abastecimento de alimentos ricos em nutrientes e inócuos para o homem, contudo, seu abastecimento regular requer o armazenamento e transporte, operações que demandam certo tempo, durante o qual os produtos ficam expostos à ação deletéria de vários tipos de agentes deteriorantes. Para evitar a ação desses agentes, as indústrias lácteas utilizam a tecnologia dos alimentos como ferramenta para garantir a conservação do leite permitindo seu armazenamento e transporte aos locais de consumo. Um dos procedimentos físicos disponíveis para o beneficiamento do leite, a fim de aumentar a vida útil deste alimento, é a aplicação do calor (PEREDA, 2005; ROCA e col., 2010). O uso do calor no leite fluido para consumo humano possui as seguintes funções básicas:

- eliminação de bactérias patogênicas;
- redução/eliminação de bactérias deteriorantes;
- inativação das enzimas intrínsecas ao leite.

Todo processamento térmico legalmente permitido para o leite, promove a destruição dos patógenos pela ação letal do calor e inativação da lipase, sendo os principais métodos classificados como pasteurização e esterilização. O processo de pasteurização não promove a eliminação de todas as bactérias deteriorantes e, por isso, o leite deve ser mantido refrigerado durante sua vida útil. Os procedimentos de esterilização eliminam todas as bactérias e inativam a maioria das enzimas do leite, permitindo seu armazenamento à temperatura ambiente se manuseado e empacotado sob sistema asséptico após o tratamento térmico (CHANDAN e col., 2008).

Segundo a Instrução Normativa nº 62 de 2011 do MAPA, leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do leite cru refrigerado em propriedade rural destinado ao consumo humano na sua forma fluida, após submissão a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, denominado pasteurização rápida (*High Temperature-Short Time*, HTST). O tempo de retenção de 15 segundos é facilmente realizado impulsionando-se o produto através de determinado comprimento com fluxo específico. Em estabelecimentos de laticínios de pequeno porte pode ser adotada a pasteurização lenta (*Low Temperature-Long Time*, LTLT) à temperatura de 65°C por 30 minutos para a produção de leite pasteurizado para abastecimento público ou para a produção de derivados lácteos (BRASIL, 2011; CHANDAN e col., 2008).

Entende-se como leite UAT, o leite submetido a uma temperatura entre 130 a 150°C durante 2 a 4 segundos (BRASIL, 1997). Com tratamento UAT do leite busca-se obter um produto microbiologicamente estável para permitir seu armazenamento à temperatura ambiente por longo período. A elaboração de leite UAT ocorre mediante dois métodos:

- UAT indireto: pelo uso de trocadores de calor;
- UAT direto: por injeção de vapor (PEREDA e col., 2005).

No método indireto, o calor é transferido de um meio de aquecimento para o produto por meio de uma parede divisória, enquanto no método direto o leite entra em contato direto com o meio de aquecimento, no caso, vapor de água.

O sistema direto de processamento UAT pode ocorrer de dois modos:

- injeção direta de vapor: o vapor de qualidade sanitária entra em contato com o leite e a quantidade de água incorporada é posteriormente removida;

- infusão direta de vapor: consiste em passar o leite pré-aquecido através de uma câmara de vapor pressurizado (tipo *spray*). Com o aumento da superfície de exposição, ocorre um aquecimento mais rápido e uniforme das partículas de leite.

O sistema indireto de processamento UAT pode ser realizado através de três diferentes sistemas: trocadores de calor tubular, trocadores de calor a placas e trocadores de calor com superfície raspada. (UFSC, 2013).

Trocadores de calor com superfície raspada são amplamente utilizados em indústrias alimentícias, pois permitem que fluidos viscosos como o leite possam ser processados. A principal característica deste trocador de calor em relação aos convencionais é a presença de um elemento móvel, o raspador, montado em um rotor que promove um notável incremento no coeficiente de transferência de calor em líquidos viscosos (TICONA, E. M., 2007).

1.11 ESTADO DA ARTE A RESPEITO DO IMPACTO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO SOBRE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS EM LEITE

Para a avaliação da exposição e estabelecimento de LMR de medicamentos veterinários ainda não são considerados os efeitos provocados pelo processamento térmico dos alimentos, bem como seu armazenamento, sendo considerados os alimentos crus. No Brasil, o MAPA através do Decreto nº 30.691 de 1952 obriga a pasteurização em estabelecimentos apropriados de todo tipo de leite ofertado para o consumo humano. No entanto, informações sobre o efeito do aquecimento do leite sobre os resíduos de antimicrobianos são fundamentais para determinar se os tradicionais processos de tratamento térmico alteram a quantidade e a identidade dos eventuais resíduos presentes, para que essas informações possam ser consideradas nos cálculos de estimativas de ingestão (SPISSO, 2006).

O tratamento térmico do leite pode alterar a atividade antimicrobiana dos resíduos de antibióticos pela degradação dos princípios ativos e promover o aparecimento de produtos de transformação que podem ser até mais tóxicos que os originais (ZORRAQUINO e col., 2011). A inativação ou modificação do antimicrobiano é um dos mecanismos reconhecidos como responsáveis pela resistência a antimicrobianos (SCHMIEDER, EDWARDS, 2012).

Tradicionalmente, a estabilidade térmica de antibióticos é avaliada pela diminuição da atividade antimicrobiana contra micro-organismos suscetíveis após tratamentos térmicos. A maioria dos estudos de estabilidade térmica avaliou a degradação de medicamentos precursores e poucos deles discorreram sobre a possível formação de produtos de degradação tóxicos (HSIEH, 2011).

Um levantamento bibliográfico na base de dados *SciFinder Scholar* demonstrou ser muito escasso o número de publicações relacionadas ao efeito do tratamento térmico sobre antibióticos macrolídeos em leite. Até o momento foram identificados apenas dois artigos sobre esse tema: o primeiro empregou métodos baseados na redução da atividade antimicrobiana de macrolídeos e lincosamidas em leite, o segundo utilizou técnicas cromatográficas para a avaliação do efeito do processamento térmico doméstico sobre resíduos de tilosina, eritromicina, espiramicina e cloranfenicol em leite. Os resultados encontrados estão apresentados no quadro 6.

Quadro 6 - Resultados dos trabalhos encontrados no levantamento bibliográfico.

Autores	Condição térmica empregada	Macrolídeos estudados	% Inativação observada
Zorraquino e col, 2011	120°C / 20 min	Eritromicina	93
		Espiramicina	64
		Tilosina	51
	140°C / 10 seg	Eritromicina	30
		Espiramicina	35
		Tilosina	12
	60°C / 30 min	Eritromicina	21
		Espiramicina	13
		Tilosina	NS
Shalaby e col., 2010	100°C / 5 min	Eritromicina	54
		Espiramicina	57,4
		Tilosina	35

NS : efeito não significativo.

Fonte: Adaptado de Zorraquino e col. (2011); Shalaby e col. (2010).

No estudo realizado por Zorraquino e col. (2011), a tilosina, entre os macrolídeos estudados, foi a que apresentou as menores taxas de inativação em

todas as condições térmicas empregadas. O tratamento a 140°C por 10 segundos (condições semelhantes às do tratamento térmico usado na produção de leites UAT) resultou em uma porcentagem de inativação da tilosina de 12%, enquanto no tratamento térmico a 60°C por 30 minutos (condições semelhantes às do tratamento térmico usado na pasteurização lenta), os efeitos não foram significativos. Na pesquisa realizada por Shalaby e col. (2010), a tilosina, entre os macrolídeos avaliados, também apresentou a menor inativação pelo calor, levando a acreditar que esta molécula apresenta maior estabilidade térmica em relação aos outros macrolídeos em estudo.

Segundo estes artigos recentes, a degradação da molécula de tilosina será maior quanto mais drástico for o processamento térmico aplicado, ou seja, quanto maior o tempo de exposição a altas temperaturas. Isso pode acarretar em desnaturação de proteínas, perda de água e gordura e modificação da acidez ou alcalinidade levando a perdas de nutrientes e danos sensoriais, o que torna o leite processado impróprio ou inadequado para o consumo humano. Além disso, todos esses processos podem mudar a concentração e a natureza química das substâncias presentes, assim como a velocidade das reações químicas (SHALABY e col., 2010).

1.12 ESTADO DA ARTE A RESPEITO DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE

Os reduzidos valores de LMR estabelecidos pelos órgãos internacionais e nacionais, que regulam os níveis de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, e a complexidade dessas matrizes requerem o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, seletivas e robustas. O Quadro 7 expõe os resultados da pesquisa bibliográfica realizada por Costa (2012), das técnicas mais utilizadas para a determinação do antibiótico macrolídeo tilosina no leite, no período de 2007 a 2012, atualizada para o ano de 2013.

Quadro 7: Resultados do levantamento bibliográfico de Costa (2012), atualizado para 2013.

Ano	Técnica Usada		
	Cromatográfica	Microbiológica	Imunoquímica
2013	Freitas e col.	Nagel e col.	-
2012	Juan e col.	Nagel e col.	Peng e col.; Burkin e col.
2011	Bilandzic e col.; Clark e col.; Sanli e col.	Bilandzic e col.; Nagel e col.	Gradinaru e col.; Karamibonari e col.; Movassagh e col.; Bilandzic e col.; Su e col.
2010	Juan e col.; Sokol e col.; Vidal e col.	-	-
2009	Bohm e col.;	Althausa e col.; Sierra e col.	-
2008	Stolker e col.; Turnipseed e col.; Aguilera-Luiz e col.	Mohsenzadeh e col.	Bang-Ce e col.
2007	Wang e col.	Linage e col.; Litterio e col.	-
Total de Publicações	13	9	8

Fonte: Adaptado de COSTA, R.P. (2012).

Os resultados da pesquisa realizada por Costa em 2012, atualizada em 2013, mostram que a análise de resíduos de tilosina no leite tem sido realizada preferencialmente por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) utilizando detectores ultravioleta/visível (UV-Vis), fluorescência e mais recentemente, espectrômetros de massas (MS). As duas primeiras técnicas oferecem informações limitadas sobre as estruturas das moléculas e as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à

Espectrometria de Massas (LC-MS) têm se constituído em ferramentas cada vez mais poderosas na identificação e quantificação de drogas, metabólitos e produtos de degradação. Os métodos microbiológicos e imunoquímicos de triagem não são capazes de fornecer informações inequívocas sobre a estrutura das substâncias originais e de eventuais produtos de degradação. As técnicas de LC-MS são mais adequadas para este propósito e possibilitam a obtenção de métodos analíticos com especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, recuperação e exatidão aceitáveis (JUAN, 2010).

1.13 USO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MACROLÍDEOS, PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E IMPUREZAS

Dentre as possíveis aplicações da espectrometria de massas na análise de macrolídeos estão a identificação, quantificação e elucidação estrutural dos macrolídeos, seus produtos de biotransformação, suas impurezas e produtos de degradação. Os espectrômetros de massas mais frequentemente utilizados para esta finalidade são o simples quadrupolo, o triplo quadrupolo e o híbrido quadrupolo-tempo de voo (CHOWDHURY, 2005).

As técnicas de ionização à pressão atmosférica mais comumente empregadas são a ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) e a ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization*, ESI). Tanto a ESI quanto APCI são técnicas brandas de ionização que possibilitam a protonação ou a desprotonação de moléculas, o que facilita a identificação dos compostos, sem a obrigatoriedade do uso de bibliotecas de espectros. Na análise de macrolídeos predomina o uso da ESI. Devido à presença de nitrogênio em suas moléculas são facilmente protonáveis a íons com carga simples, dupla ou tripla ($[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$, respectivamente) em fontes ESI no modo positivo. O número de cargas possíveis de serem acomodadas nas moléculas está relacionado ao número de nitrogênios presentes nas mesmas. A tilosina, por exemplo, forma apenas íons monoprotonados (CHOWDHURY, 2005; SISMOTTO e col., 2013).

Com o espectrômetro de massas simples ou triplo quadrupolo, dados de massa são obtidos por varredura no primeiro quadrupolo e os íons são separados

por sua relação massa/carga. Dados relacionados aos íons produtos são obtidos somente com o triplo quadrupolo, onde os íons de interesse são selecionados no primeiro quadrupolo, fragmentados na célula de colisão e separados no terceiro quadrupolo para subsequente detecção. O triplo quadrupolo permite ainda realizar experimentos de perdas neutras constantes e íons precursores (CHOWDHURY, 2005).

A varredura de perdas neutras e a varredura do íon precursor facilitam enormemente o processo de identificação de metabólitos e produtos de degradação. Uma varredura de perdas neutras constantes permite a detecção de todos os compostos ionizados que perdem uma entidade específica (por exemplo, H_2O e SO_3 dentre outros) mediante dissociação induzida por colisão; e a varredura do íon precursor permite a detecção de todos os compostos ionizados que dão origem a um íon produto específico mediante dissociação induzida por colisão (CHOWDHURY, 2005).

Por fim, o espectrômetro de massas triplo quadrupolo permite ainda operar no modo monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM), onde íons específicos (íons precursores) são previamente selecionados no primeiro quadrupolo, fragmentados na célula de colisão e os íons fragmentos específicos (íons produtos) detectados no terceiro quadrupolo (CHOWDHURY, 2005).

Além dos espectrômetros de massas com analisadores quadrupolo (Q), analisadores do tipo armadilha de íons (*ion trap*, IT) e tempo de voo (*time-of-flight*, TOF), os sistemas híbridos, como o quadrupolo-tempo de voo (QqTOF), quadrupolo-armadilha de íons-tempo de voo (QITTOF) e quadrupolo-armadilha de íons linear (QqQLIT), tem sido bastante empregados na elucidação estrutural, pois os dois primeiros possibilitam a aquisição de espectro de massas sequenciais com altas resolução, exatidão de massa e sensibilidade, enquanto o último combina a seletividade e a robustez de um triplo quadrupolo (QqQ) com a sensibilidade de uma varredura de MS-MS de um sistema de armadilha de íons linear (QLIT) (GENTILLI, 2005).

Recentemente devido a esse crescente interesse de pesquisadores em detectar e identificar compostos em amostras complexas, incluindo seus metabólitos e produtos de degradação, foi introduzido no mercado outro analisador de massas, o quadrupolo-quadrupolo/tempo-de-voo (TOF-MS/MS ou Triplo-TOF®), um híbrido da plataforma triplo quadrupolo com tempo-de-voo. Esse inovador sistema reúne as

maiores características de um analisador tipo triplo-quadrupolo com a exatidão de massas de um TOF, o que permite uma quantificação de compostos com alta sensibilidade, exatidão e linearidade, e ao mesmo tempo uma identificação inequívoca baseada nas informações MS e MS/MS (AB SCIEX, 2010).

Diversas técnicas de espectrometria de massas tem sido usadas na identificação e quantificação de macrolídeos, seus produtos de biotransformação, produtos de degradação e impurezas como a LC-MS (HORIE, M., 2003); LC-MS/MS (AGUILERA-LUIZ e col., 2008; BOGIALLI, e col., 2007; DUBOIS, M. e col. 2001; FREITAS e col., 2013; JUAN e col., 2010; NAKAJIMA e col., 2011; TANG e col., 2012) e LC-QqQLIT (GROS e col., 2013).

1.14 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE TILOSINA EM LEITE

O preparo de uma amostra consiste na extração de uma substância química (normalmente em baixa concentração) de uma amostra com subsequente purificação do extrato para isolar o analito de interesse e eliminar quaisquer componentes que possam interferir no sistema de detecção. O emprego da LC-MS, geralmente, requer um preparo de amostra menos elaborado quando comparado a HPLC com detecção ótica. Não é recomendável, entretanto, subestimar a etapa de preparo de amostras para a detecção e quantificação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos por espectrometria de massas, devido à complexidade deste tipo de matriz, o que pode dificultar bastante o procedimento analítico devido à supressão de íons, à formação de adutos, entre outros efeitos. O tratamento das matrizes alimentícias geralmente requer procedimentos para a desproteinização, remoção de gordura e açúcares. Um método de preparo de amostra a ser aplicado no monitoramento e controle de resíduos de antimicrobianos em alimentos deve apresentar as seguintes características: rápido, de baixo custo, baixo consumo de solventes, não laborioso e robusto (SISMOTTO e col., 2013).

Diferentes estratégias têm sido utilizadas por diferentes pesquisadores para extrair resíduos de tilosina e fazer o *clean-up* da matriz de leite tais como: a extração líquido-líquido (ELL) (TANG e col., 2012), extração em fase sólida (EFS) (BOHM e col.; 2009; DUBOIS e col., 2001; FREITAS e col., 2013; TURNIPSEED e col., 2008),

extração com fluido pressurizado (PLE) (JUAN e col., 2010), extração em fase sólida dispersiva (EFS-dispersiva), dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) (BOGIALLI e col., 2007). Estes métodos possuem como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, o que aumenta o custo da análise, demanda analistas treinados, etapas de limpeza no intervalo entre as extrações, e um *clean-up* trabalhoso (SISMOTTO e col., 2013).

Em 2003, o cientista Anastassiades, objetivando atender aos rigorosos Limites Máximos de Resíduos (LMR), publicou um método eficaz para a análise multiresíduo de pesticidas em frutas por LC-MS/MS ou GC-MS/MS. O nome sugerido pelo autor foi QuEChERS, do inglês: **Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged e **S**afe, ou seja, rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. O método QuEChERS original baseia-se nas seguintes etapas sucessivas:

1) Extração com acetonitrila (MeCN) tamponada: possibilita a extração de pequenas quantidades de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra.

2) Partição líquido-líquido após adição dos sais secantes sulfato de magnésio (MgSO₄) e cloreto de sódio (NaCl): induz ao efeito chamado *salting out*, onde ocorre a separação de fases de forma que os analitos de interesse migram para a fase extratora do solvente devido à redução da solubilidade destes compostos na fase aquosa e a maior parte dos interferentes da matriz permanece na fase aquosa.

3) Separação da fase aquosa e dos sais por centrifugação.

4) Retirada de uma alíquota da fase orgânica para *clean-up* por EFS-dispersiva para remoção de ácidos orgânicos, excesso de água e outros componentes visando a redução do efeito matriz através da combinação de sorventes como amina primária e secundária (PSA) e sulfato de magnésio.

5) Análise dos extratos por técnicas de espectrometria de massas após separação cromatográfica.

A praticidade e os excelentes resultados fornecidos pelo método QuEChERS ajudaram na popularização deste método. Em 2007, este método foi adotado como método oficial da Associação de Química Analítica Oficial (*Association of Official Analytical Chemistry*, AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos. As vantagens em relação aos demais métodos desenvolvidos até a ocasião são o uso de pouca vidraria de laboratório, reduzido número de etapas, facilidade de execução, volume mínimo de consumo de solvente orgânico e fase sólida, melhores recuperações e a possibilidade de preparar um grande número de

amostras simultaneamente, o que torna o método rápido, barato e robusto (COSTA, 2010; ANASTASSIADES e col, 2003; AOAC, 2007; PRESTES e col., 2011).

Inicialmente, este método era aplicável somente para análise de substâncias apolares em matrizes de baixo teor de gordura, no entanto, pequenas modificações possibilitaram a ampliação da sua aplicação. Trabalhos mais recentes têm usado o método QuEChERS e suas modificações para a extração e *clean-up* de diversas classes de antibióticos em leite, porém apenas dois artigos reportaram o uso dos métodos modificados de extração QuEChERS para detectar e quantificar alguns dos macrolídeos presentes neste trabalho, incluindo a tilosina, na matriz leite. AGUILERA-LUIZ e col. (2008) utilizaram em seus estudos os sais sulfato de magnésio e acetato de sódio, enquanto NAKAJIMA e col. (2012), utilizaram sulfato de magnésio, citrato trissódico e cloreto de sódio na determinação de resíduos de tilosina em leite.

1.15 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Para garantir que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer uma avaliação denominada validação. Se o método utilizado estiver descrito em um compêndio oficial e for seguido integralmente, a validação não se faz necessária; caso o método tenha sido desenvolvido no próprio laboratório, este deverá ser validado. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, ou seja, é a garantia legítima devidamente documentada de que a metodologia é adequada ao fim a que se destina (ABNT, 2005).

Existem atualmente legislações nacionais e internacionais para orientar os processos de validação intralaboratorial de metodologias analíticas para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários, como a Instrução Normativa nº 24 do MAPA e a Decisão 657/2002 da Comissão Europeia, esta relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (BRASIL, 2009; UNIÃO EUROPEIA, 2002).

O laboratório de pesquisa de Resíduos de Medicamentos Veterinários em

Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ (INCQS/ FIOCRUZ) redigiu um Procedimento Operacional Padrão (POP), com base nos principais documentos nacionais e internacionais de validação, a fim de orientar a execução e interpretação dos experimentos de validação (INCQS, 2013).

Considerando que não existe um método normalizado para análise de resíduos de tilosina em leite, se fez necessário realizar a validação do método desenvolvido para garantir a confiabilidade dos resultados.

A validação, segundo as orientações deste POP, envolve os seguintes parâmetros, quando aplicável:

- seletividade;
- efeito matriz (absoluto e relativo);
- intervalo de medição e intervalo linear;
- linearidade (intervalo linear do método)
- sensibilidade;
- limite de detecção (LOD);
- limite de quantificação (LOQ);
- limite de decisão ($CC\alpha$);
- capacidade de detecção ($CC\beta$);
- exatidão (veracidade, expressa como tendência/recuperação);
- precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade);
- estabilidade do analito.

1.15.1 Seletividade

A seletividade representa a capacidade de um método distinguir de forma inequívoca o analito de interesse na presença de componentes provenientes de misturas complexas, como por exemplo, da matriz de análise, sem a interferência de outros componentes desta mistura, ou seja, é a avaliação da interferência de outras espécies ou produtos de propriedades similares como isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação e impurezas, dentre outros, que possam, porventura, estarem presentes (IRISH National Accreditation Board, 2012; PASCHOAL e col., 2008).

1.15.2 Efeito matriz (absoluto e relativo)

A avaliação do efeito matriz tem por objetivo averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de supressão ou aumento da eficiência de ionização e, conseqüentemente do sinal instrumental ou resposta instrumental (BRASIL, 2011; PACHOAL e col., 2008).

O estudo do efeito matriz é imprescindível quando se deseja trabalhar com uma curva de calibração do analito no solvente, ou seja, com uma curva de calibração não matrizada (BRASIL, 2011). A comparação entre a resposta do analito no solvente com a resposta do analito na matriz fortificada após as etapas de extração/purificação da amostra é chamada efeito matriz absoluto. A comparação entre diferentes tipos de matriz é chamada de efeito matriz relativo (INCQS, 2013).

1.15.3 Intervalo de medição e intervalo linear

O intervalo de medição envolve o intervalo de concentrações do analito que serão utilizadas para a construção da curva de calibração buscando avaliar a linearidade do método analítico (IRISH National Accreditation Board, 2012; INMETRO, 2011).

O intervalo linear é o intervalo de concentração no qual a intensidade do sinal obtido é diretamente proporcional à concentração ou quantidade do analito que está produzindo o sinal, ou seja, é o intervalo de medição onde um instrumento de medição ou método analítico se mostrou linear. Contudo, o intervalo de medição pode certamente conter um intervalo de concentração maior que o intervalo linear, e a relação da concentração e a resposta pode não ser necessariamente linear (IRISH National Accreditation Board, 2012).

1.15.4 Linearidade (intervalo linear do método)

É a capacidade do método analítico gerar um sinal (resposta) diretamente proporcional à concentração ou quantidade do analito de interesse. A linearidade é determinada a partir da formulação de uma curva de calibração (IRISH National Accreditation Board, 2012).

Notas:

- O intervalo linear é o intervalo de concentração ou quantidade de um analito no qual o método demonstra linearidade (IRISH National Accreditation Board, 2012).
- Alguns métodos, calibrações podem fornecer ajustes não-lineares, por exemplo, ajuste quadrático (IRISH National Accreditation Board, 2012).

1.15.5 Sensibilidade

Demonstra a variação da resposta do instrumento em função da concentração do analito, ou seja, é o quociente entre a variação de uma indicação de um sistema de medição e a variação correspondente do valor da grandeza medida (concentração ou quantidade do analito) (VIM, 2012; PASCHOAL, 2008).

A sensibilidade é geralmente expressa como o coeficiente angular da curva de calibração linear, ou gradiente da função de calibração linear (IRISH National Accreditation Board, 2012).

1.15.6 Limite de detecção (LOD)

É a menor concentração ou massa de um analito que pode ser detectada com uma segurança aceitável, apesar de não quantificada com precisão aceitável (FDA, 2012).

Nota:

- O limite de detecção pode também ser estimado para o instrumento de medição ou para o método analítico.

1.15.7 Limite de quantificação (LOQ)

É a menor concentração ou massa de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (FDA, 2012). O limite inferior do intervalo de medição é geralmente considerado o limite de quantificação (IRISH National Accreditation Board, 2012, INMETRO, 2011).

1.15.8 Limite de decisão ($CC\alpha$)

É o menor nível de concentração no qual o método pode identificar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente, ou seja, é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α (UNIÃO EUROPEIA, 2002; PASCHOAL, 2008).

O erro α é a probabilidade da amostra analisada ser conforme apesar do resultado obtido ser não conforme, ou seja, é a falsa decisão não conforme, terminologia que substituiu o ‘falso positivo’ (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.9 Capacidade de detecção ($CC\beta$)

É o teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro β . Para as substâncias sem um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de $1-\beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração no limite permitido com uma certeza estatística de $1-\beta$ (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.10 Exatidão

É o grau de concordância entre o valor medido e o valor verdadeiro do mensurando (VIM, 2012). É, portanto, a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes. A exatidão pode ser obtida através do uso de material de referencia certificado (MRC), comparação de métodos ou ensaios de recuperação. Visto que existem poucos MRC disponíveis para a análise de alimentos quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários, a exatidão tem sido avaliada mediante o teste de recuperação (PASCHOAL e col, 2008).

A exatidão quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência ou bias) (PASCHOAL e col, 2008).

1.15.11 Veracidade

É o grau de concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (MAPA, 2011).

A medida da veracidade é geralmente expressa quantitativamente pela estimativa do erro sistemático denominado “tendência” (*bias*), sendo portanto, inversamente relacionada ao erro sistemático.

1.15.12 Recuperação

É a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

1.15.13 Precisão

É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (MAPA, 2011).

As condições definidas para expressar a precisão podem ser, por exemplo, condições de repetibilidade, condições de precisão intermediária ou condições de reprodutibilidade.

A precisão de medição é normamente expressa numericamente pelo desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação.

1.15.13.1 Repetibilidade de medição

É a precisão de medição sob um conjunto de condições de repetibilidade (VIM, 2012).

Entende-se como condição de repetibilidade a condição de medição em um conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição (método de análise), os mesmos operadores (analistas), o mesmo sistema de medição (conjunto de instrumentos de medição, reagentes e insumos), as mesmas

condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (VIM, 2012).

1.15.13.2 Precisão intermediária de medição

É a precisão de medição sob um conjunto de condições de precisão intermediária (VIM, 2012).

Entende-se como condição de precisão intermediária a condição de medição em um conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição (método de análise), o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto (material de ensaio) ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas a mudanças (VIM, 2012).

1.15.14 Estabilidade do analito

A avaliação da estabilidade do analito em solução, na matriz e no extrato é extremamente importante, já que uma degradação do mesmo ou dos constituintes da matriz durante a estocagem ou análise da amostra podem afetar a exatidão dos resultados (PASCHOAL e col, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes condições de processamento térmico sobre resíduos de tilosina em leite, a fim de verificar se há redução na concentração dos resíduos, bem como a formação de produtos de degradação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito de diferentes condições de tempo/temperatura, mimetizando as condições de pasteurização e de ultra-alta temperatura sobre a substância tilosina em solução, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação de resíduos de tilosina em leite por LC-MS/MS, com detector do tipo triplo quadrupolo, incluindo transições de monitoramento de reações múltiplas (MRM) de possíveis produtos de degradação, de forma que possam ser detectados pela metodologia analítica.
- Estudar o efeito de diferentes condições industriais de processamento (pasteurização lenta, pasteurização rápida e ultra-alta temperatura), sobre a substância tilosina em leite, empregando a metodologia validada.
- Utilizar a espectrometria de massas de alta resolução (triplo TOF), a fim de auxiliar na identificação dos possíveis produtos de degradação formados em solução e no leite.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Padrões

O sal tartarato de tilosina foi adquirido da Farmacopeia Americana (Cat. No. 1703850, Lot No. F0D333). A roxitromicina, usada como padrão interno qualitativo, foi fornecida pela empresa Dr. Ehrenstorfer (Cat. No. C16860000, Lot No. 90630, Alemanha). Outros seis macrolídeos foram usados na avaliação da seletividade durante a validação. Esses macrolídeos foram:

- a) espiramicina (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- b) troleandomicina (USP, EUA);
- c) oleandomicina (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- d) tilmicosina (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha);
- e) eritromicina (USP, EUA);
- f) claritromicina (Farmacopeia Brasileira, Brasil).

3.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados foram:

- a) acetonitrila (ACN) grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- b) acetonitrila (ACN) grau HPLC-MS (Merck, Alemanha);
- c) metanol (MeOH) para cromatografia líquida ou para UV/CLAE (J. T. Baker, EUA);
- d) ácido fórmico (FOA) pureza >99% (Merck, Alemanha);
- e) ácido acético pureza >99% (Merck, Alemanha);
- f) ácido trifluoroacético (TFA) pureza >99% (Merck, Alemanha);
- g) acetato de amônio pureza >99% (Merck, Alemanha);
- h) água purificada tipo I (Milli-Q);
- i) sulfato de sódio anidro granulado (Na_2SO_4) pureza $\geq 99\%$ (Merck, Alemanha);
- j) cloreto de sódio Suprapur (NaCl) pureza 99,99% (Merck, Alemanha);

- k) carbonato de potássio PA (K_2CO_3) pureza $\geq 99\%$ (Merck, Alemanha);
- l) Sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) pureza $\geq 99\%$ (Merck, Alemanha);
- m) Bondesil-PSA, 400M (Varian, EUA);
- n) Nucleosil® 120-5 C₁₈;
- o) Kit QuEChERS roQ dSPE (KSO-8926) (Phenomenex Allcron).

3.1.3 Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados foram:

- Para as etapas de extração, preparo de soluções e armazenamento:
 - a) balança semi-micro com resolução de 0,00001g (Metler Toledo, Suíça);
 - b) balança analítica LP 620P (Sartorius, Alemanha);
 - c) módulo de aquecimento com unidade de evaporação com vapor de nitrogênio React-Therm III (Pierce, EUA);
 - d) termômetro digital de imersão parcial para módulo de aquecimento (-50°C a +70°C) (VWR, EUA);
 - e) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
 - f) sistema de obtenção de água tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA);
 - g) agitador de tubos tipo vórtex (MARCONI, Brasil);
 - h) freezer de ultra-baixa temperatura CL374-80V (ColdLab, Brasil);
 - i) refrigerador Frost Free DF34 (Electrolux, Suécia);
 - j) capela de exaustão.
- Para o processamento térmico do leite:
 - a) trocador de calor de superfície raspada FT25D S.S.H.E (Armafield, Inglaterra);
 - b) recipiente de inox.
- Para o processamento térmico das soluções:
 - a) banho termostático YZ-220V (Zeferquim Comércio de Materiais de Lab. LTDA, Brasil);
 - b) banho termostático 2866 (Thermo Scientific, EUA);
 - c) banho termostático 6022 (Fluke, Inglaterra).

- Para a separação e detecção das substâncias (sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial triplo quadrupolo):
 - a) cromatógrafo à líquido de alta eficiência, composto de uma bomba quaternária LC-20AD, um degaseificador de membrana DGU-20A5, um autoamostrador SIL-20AC, um forno de coluna CTO-20AC e uma bomba controladora CBM-20^a (Shimadzu Prominence, EUA);
 - b) espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 5000 (Applied Biosystems/MDS Sciex, com interface Turbo Ion Spray®);
 - c) coluna analítica Varian Polaris® C18 (100mm x 2mm x 3µm de tamanho de partícula);
 - d) coluna de guarda de mesmo material da coluna analítica.

- Para a separação e identificação das substâncias (sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução por tempo de voo – TOF)
 - a) cromatógrafo à líquido de alta eficiência modelo Agilent 1260, composto de uma bomba composto de uma bomba binária, um degaseificador de membrana, um autoamostrador, um forno de coluna (Shimadzu Prominence, EUA);
 - b) espectrômetro de massas triplo quadrupolo AB SCIEX Triple TOF 5600;
 - c) coluna analítica C18 Sinergi Fusion – RP (50mm x 2mm x 2,53µm de tamanho de partícula);

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Preparo das soluções-estoque

Soluções estoque individuais foram preparadas fim de se obter uma solução na concentração de aproximadamente 1000µg/mL em metanol. A massa teórica pesada para cada padrão foi calculada considerando-se as correções de pureza,

teor de água e base livre. As soluções foram transferidas para microtubos e armazenadas em freezer a temperatura igual ou menor a -70°C e diluídas sempre que necessário para o preparo das soluções de trabalho.

3.2.2 Testes de degradação da tilosina A

Uma vez que os padrões de tilosina B, C e D não eram disponíveis, tentou-se obter as substâncias em laboratório, a partir da degradação ácida e da degradação pelo calor de solução padrão de tilosina A. Uma solução a 100 ng/mL em água foi preparada e posteriormente diluída de forma a se obter soluções padrão de tilosina A a 50 ng/mL em metanol na proporção (1:1, v/v) com: 0,1% de FOA em água, 0,1% de TFA em água, 0,1% de ácido acético em água e 0,1% de acetato de amônio em água (quadro 8). As mesmas soluções foram preparadas também em acetonitrila, ao invés de metanol como solvente orgânico.

O teste de degradação pelo calor foi realizado com as mesmas soluções descritas acima, sem a adição do solvente orgânico, que foi acrescentado posteriormente, utilizando-se um banho-maria à temperatura de 80°C por até 14h.

Quadro 8: pH medido das soluções para teste de degradação da tilosina.

Solução	pH medido*
solvente orgânico:H ₂ O com 0,1% de FOA	3,07
solvente orgânico:H ₂ O com 0,1% de ácido acético	3,75
solvente orgânico:H ₂ O com 0,1% de TFA	2,13
solvente orgânico:H ₂ O com 0,1% de NH ₄ OAc	7,20

*Antes da adição do solvente orgânico.

3.2.3 Otimização

A otimização das condições ideais de ionização dos macrolídeos no modo eletrospray positivo (ESI+) no espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) foi realizada através da infusão contínua de soluções individuais dos analitos na concentração de 50 ng/mL em MeOH:H₂O com 0,1% de FOA e ACN:H₂O com 0,1% de FOA, com auxílio de uma bomba de seringa (Havard Apparatus,

Canadá). As substâncias que apresentaram intensidade de sinal muito alta foram diluídas até no máximo 12,5 ng/mL para realização de nova infusão.

Para a otimização da tilosina, foi preparada uma solução duas vezes mais concentrada que as demais (100 ng/mL) na tentativa de se obter os valores ótimos de *Declustering Potential* (DP), *Collision Energy* (CE) e *Collision Exit Potential* (CXP) para as tilosinas B, C e D, além da tilosina A. Para a otimização da tilosina A foi feita a infusão da solução 100 ng/mL em MeOH:H₂O com 0,1% de FOA e ACN:H₂O com 0,1% de FOA, enquanto para a otimização das demais tilosinas foram infundidas as soluções a 50 ng/mL dos testes de degradação ácida e pelo calor descritos na seção 3.2.2, diluídos 1:1 com ACN. Diferentes modos de operação MS/MS foram empregados como: varredura total, varredura de íons produtos, varredura de íons precursores, varredura de perdas neutras constantes e monitoramento de reações múltiplas (MRM).

3.2.4 Estudos de desenvolvimento de um método cromatográfico e espectrométrico para a separação e detecção das tilosinas A, B, C e D e para os macrolídeos incluídos no estudo de seletividade do método validado

Inicialmente testes foram realizados a fim de desenvolver dois métodos cromatográficos: um capaz de separar somente a tilosina A, tilosina B e tilosina C, e outro para a separação dos macrolídeos incluídos nos estudos de seletividade, além das tilosinas A, B e C. Os testes cromatográficos realizados basearam-se em um método pré-existente no laboratório para a separação e detecção de antibióticos da classe dos ionóforos poliéteres em leite, variando-se o gradiente de eluição e as condições cromatográficas (PEREIRA, 2013). As condições cromatográficas e o programa de eluição deste método estão dispostos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Condições cromatográficas do método de detecção de ionóforos poliéteres em leite (PEREIRA, 2013)

Fases móveis	Fluxo da fase móvel	Temperatura do forno	Tempo total de corrida
A: 0,1% FOA em água			
B: 0,1% FOA em ACN	0,3mL/minuto	35°C	18 min
C: 0,1% FOA em MeOH			

Tabela 2: Programa de eluição gradiente do método de detecção de ionóforos poliéteres em leite.

Tempo (min)	%A	%B	%C
0	93	7	0
4	20	80	0
4,1	5	95	0
6	0	100	0
8	0	100	0
8,5	0	0	100
11,5	0	0	100
12	93	7	0
18	93	7	0

Primeiramente, tentativas foram feitas para a elaboração de um método capaz de separar e detectar somente os produtos de degradação da tilosina A (tilosinas B e C), além da própria tilosina A. Posteriormente, outro método foi desenvolvido visando à determinação da tilosina A, tilosina B, tilosina C e mais sete macrolídeos incluídos nos estudos de seletividade durante a validação (espiramicina, troleandomicina, oleandomicina, roxitromicina, eritromicina, tilmicosina e claritromicina) através da injeção de solução padrão mix contendo os analitos do estudo da seletividade a 50ng/mL em acetonitrila:água (1:1, v/v) com 0,1% de ácido fórmico e das soluções provenientes dos teste de degradação da tilosina A neste mesmo diluente.

Os parâmetros cromatográficos do método de separação de ionóforos poliéteres em leite foram testados primeiramente na coluna analítica Kinetex™. Phenomenex (C18, 2,6 µm, 50 x 2,1 mm). A otimização dos parâmetros espectrométricos dependentes do analito, além da DP, CE e CXP, como o *CAD Gas* (CAD, pressão do gás de colisão na célula de colisão), bem como dos parâmetros dependentes da fonte *Curtain Gas* (CUR, gás de cortina, que flui entre a *curtain plate* e a *orifice plate*), *Gas 1* (GS1, gás nebulizador), *Gas 2* (GS2, gás auxiliar, turbo), *IonSpray Voltage* (IS, voltagem aplicada à agulha que ioniza a amostra na fonte), *Temperature* (TEM, temperatura do gás turbo) foi efetuada a fim de aumentar a sensibilidade do método para os macrolídeos testados (Tabela 3). A coluna analítica Polaris® (C-18A, 3 µm, 100 mm x 2 mm, Agilent) foi também testada e os resultados obtidos foram comparados a fim de escolher a coluna capaz de fornecer

picos com boa resolução, simetria, menor largura possível no menor tempo de eluição.

A otimização dos parâmetros espectrométricos, a fim de aumentar a sensibilidade dos macrolídeos testados, foi realizada variando-se os parâmetros CAD, CUR, GS1, GS2, IS e TEM (Tabela 3).

Tabela 3: Condições iniciais e valores testados para a otimização espectrométrica dos macrolídeos.

Parâmetros	Condições iniciais	Valores testados
CAD	10	4, 6, 8 e 10
CUR	10	10, 12 e 15
GS1	55	40, 45, 50 e 55
GS2	55	40, 45, 50 e 55
IS	4500	4500, 5000 e 5500
TEM	450	450, 500, 550 e 600

3.2.5 Condições cromatográficas e espectrométricas desenvolvidas no Triplo-TOF

Para a identificação de possíveis produtos de degradação da tilosina por LC-TOF/MS, testes foram realizados a fim de se obter as condições cromatográficas e espectrométricas para a tilosina neste equipamento devido a sua maior sensibilidade. Para esta finalidade foi utilizada uma coluna analítica C18 (Sinergi Fusion 50 mm x 2 mm x 2,53 μm) e uma solução padrão de tilosina a 250 ng/mL em acetonitrila:água.

3.2.6 Obtenção e armazenamento de amostras

Amostras de leite UAT, pasteurizado e em pó integrais foram obtidas em supermercados da região metropolitana do Rio de Janeiro. Uma amostra de leite em pó desnatado para uso laboratorial (Skim milk[®], BD Difco[™]) também foi incluída. A maioria das amostras de leite cru já se encontravam disponíveis no laboratório (armazenadas em freezer a temperatura inferior a -70°C) e uma amostra foi adquirida em uma fazenda produtora de leite localizada em Seropédica – RJ. Todos os leites foram analisados para garantir isenção dos analitos de interesse (Tabela 4). As amostras de leite UAT, pasteurizado e cru foram homogeneizadas manualmente

e transferidas para tubos de centrífuga de polipropileno, já as amostras de leite em pó foram reconstituídas com água tipo I conforme a indicação do fabricante e armazenadas em frascos de polipropileno Nalgene®. Todas as amostras foram armazenadas em freezer de ultra baixa temperatura ($\leq 70^{\circ}\text{C}$) e descongeladas sempre que necessário para uso.

Tabela 4: Leites avaliados para verificar a ausência de macrolídeos.

Tipo de Leite	Código do laboratório	Observação
UAT	031/2013	-
	032/2013	-
	033/2013	-
	035/2013	-
	042/2013	-
	049/2013	-
	050/2013	-
	051/2013	-
	052/2014	-
	053/2013	-
	054/2013	-
	055/2013	-
	056/2013	-
	057/2013	-
	058/2013	-
	066/2013	-
	067/2013	-
Pasteurizado	037/2013	-
	038/2013	-
	039/2013	-
	040/2013	-
	041/2013	-
	062/2013	-
	063/2013	-
	064/2013	-
065/2013	-	
Pó	043/2013	-
	044/2013	-
	045/2013	-
	046/2013	-
	047/2013	-
	059/2013	-
	060/2013	-
061/2013	-	
	ABR-2013/007	Skim milk®

Tipo de Leite	Código do laboratório	Observação
Cru	ABR-2012/007	Gonçalves - MG
	ABR-2012/008	Gonçalves – MG
	ABR-2012/010	Gonçalves – MG
	ABR-2012/011	Gonçalves – MG
	ABR-2012/012	Gonçalves – MG
	ABR-2013/008	Seropédica - RJ

3.2.7 Procedimentos de extração/purificação testados

Os procedimentos de extração e purificação testados basearam-se inicialmente nos testes realizados por Spisso, em 2010, onde um método de extração de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos (tilosina, eritromicina e claritromicina) e lincosamidas em ovos por LC-MS/MS foi desenvolvido. Este foi utilizado por Pereira, em 2012, como referência para o desenvolvimento de outro método capaz de extrair resíduos de ionóforos poliéteres na matriz leite. Pereira (2012) comparou em seu estudo dois métodos de extração: extração simples com solvente orgânico (acetonitrila) e extração por QuEChERS, utilizando-se sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e acetato de sódio ($NaOAc$) neste procedimento.

A fim de se desenvolver um método de extração de resíduos de macrolídeos em leite, foram feitas adaptações nos dois métodos de extração desenvolvidos por Pereira (2012), e proposto um método QuEChERS inovador empregando-se uma mistura de três sais, com base em um método desenvolvido pela empresa Agilent® (Califórnia, Estados Unidos), que utiliza apenas dois dos três sais empregados.

O método desenvolvido pela Agilent® emprega os sais Na_2SO_4 e $NaCl$ na primeira etapa de extração, com posterior *clean-up* por extração por fase sólida dispersiva (d-SPE) para extrair 36 medicamentos de uso veterinário de produtos de origem animal, incluindo o leite (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

A partir destes estudos, a composição de sais testados para a extração de macrolídeos em leite foi:

- 0,8g sulfato de sódio (Na_2SO_4);
- 0,2g cloreto de sódio ($NaCl$);
- 0,4g carbonato de potássio (K_2CO_3).

Para o *clean-up* da amostra por d-SPE foram testadas seis diferentes composições de sais conforme descrito na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5: Composição de sais testados para *clean-up* por d-SPE.

Teste	Sais de extração			Sais de <i>clean-up</i>		
1						
2				150mg MgSO ₄	50mg PSA	50mg C18
3				150mg MgSO ₄	50mg PSA	
4	0,8g Na ₂ SO ₄	0,2g NaCl	0,4g K ₂ CO ₃	150mg MgSO ₄		50mg C18
5				150mg Na ₂ SO ₄	50mg PSA	50mg C18
6				150mg Na ₂ SO ₄	50mg PSA	
7				150mg Na ₂ SO ₄		50mg C18

3.2.7.1 Soluções padrão em acetonitrila:água (1:3, v/v) para fortificação do leite

- a) **P0** - solução de roxitromicina (padrão interno) a 50 ng/mL.
- b) **P1** - solução dos analitos alvo a 0,2 µg/mL para ERI; 0,25 µg/mL para TIL, e OLE; 1 µg/mL para ESPI e 0,2 µg/mL para CLARI, TROL, equivalente a 0,125 LMR / 0,5 LQ.
- c) **P2** - solução dos analitos alvo a 0,4 µg/mL ERI; 0,5 µg/mL TIL, OLE; 2 µg/mL ESPI; 0,4 µg/mL CLARI, TROL equivalente a 0,25 LMR / 1 LQ.
- d) **P3** - solução dos analitos alvo a 0,8 µg/mL ERI; 1 µg/mL TIL, OLE; 4 µg/mL ESPI; 0,6 µg/mL CLARI, TROL, equivalente a 0,5 LMR / 1,5 LQ.
- e) **P4** - solução dos analitos alvo a 1,6 µg/mL ERI; 2 µg/mL TIL, OLE; 8 µg/mL ESPI; 0,8 µg/mL CLARI, TROL, equivalente a 1 LMR / 2 LQ.
- f) **P5** - solução dos analitos alvo a 2,4 µg/mL ERI; 3 µg/mL TIL, OLE; 12 µg/mL ESPI; 1 µg/mL CLARI, TROL, equivalente a 1,5 LMR / 2,5 LQ.
- g) **P6** - solução dos analitos alvo a 3,2 µg/mL ERI; 4 µg/mL TIL, OLE; 16 µg/mL ESPI; 1,2 µg/mL CLARI, TROL, equivalente a 2 LMR / 3 LQ.
- h) **P7** - solução dos analitos alvo a 4 µg/mL ERI; 5µg/mL TIL, OLE; 20 µg/mL ESPI; 1,4 µg/mL CLARI, TROL, equivalente a 2,5 LMR / 3,5 LQ.

i) **P8** - solução dos analitos alvo a 4,8 µg/mL ERI; 6 µg/mL TIL, OLE; 24 µg/mL ESPI; 1,6 µg/mL CLARI, TROL, equivalente a 3 LMR / 4 LQ.

3.2.7.2 Preparo de amostras brancas de reagentes (ACBR)

Amostras brancas de reagentes utilizam água em substituição ao leite isento dos analitos alvo e sem adição do padrão interno (ROXI).

A - Método direto

As amostras brancas de reagentes foram preparadas pipetando-se 2 mL de água tipo I para tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL de capacidade, onde foram adicionados 100 µL de acetonitrila:água (1:3, v/v) com posterior agitação em vórtex por 10 s e repouso por 10 min. Em seguida foram adicionadas duas porções de 4 mL de acetonitrila para extração, agitando-se em vórtex por 30 s após cada adição e centrifugadas a 10000 rpm por 5 min a 4°C.

Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi transferida para tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL, evaporado até securo a aproximadamente 45°C sob fluxo suave de nitrogênio. O extrato seco foi então reconstituído com acetonitrila:água (1:3, v/v) (solvente de diluição), agitado em vórtex por 15 s e filtrado com filtro de 0,22 µm para vial âmbar.

Este procedimento está exposto no fluxograma da Figura 3.

B - Método QuEChERS

As amostras brancas de reagentes foram preparadas pipetando-se 2 mL de água tipo I para tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL de capacidade, onde foram adicionados 100 µL de acetonitrila:água (1:3, v/v) com posterior agitação em vórtex por 10 s e repouso por 10 min. Em seguida foram adicionadas duas porções de 4 mL de acetonitrila para extração, agitando-se em vórtex por 30 s após cada adição.

Foram adicionados 0,8 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄), 0,2 g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,4 g de carbonato de potássio (K₂CO₃) com posterior repouso por 10

min. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min a 4°C.

Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi transferida para tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL, evaporado até securo a aproximadamente 45°C sob fluxo suave de nitrogênio. O extrato seco foi então reconstituído com acetonitrila:água (1:3, v/v) (solvente de diluição), agitado em vórtex por 15 s e filtrado com filtro de 0,22 µm para vial âmbar.

Este procedimento está exposto no fluxograma da Figura 4.

C - Método QuEChERS com *clean-up* por d-SPE

As amostras brancas de reagentes foram preparadas pipetando-se 2 mL de água tipo I para tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL de capacidade, onde foram adicionados 100 µL de acetonitrila:água (1:3, v/v) com posterior agitação em vórtex por 10 s e repouso por 10 min. Em seguida foram adicionadas duas porções de 4 mL de acetonitrila para extração, agitando-se em vórtex por 30 s após cada adição.

Foram adicionados 0,8 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄), 0,2 g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,4 g de carbonato de potássio (K₂CO₃) com posterior repouso por 10 min. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min a 4°C.

Após a etapa de centrifugação uma alíquota de 1000 µL do sobrenadante foi tomada, onde posteriormente foram adicionados os sais de *clean-up* citados na Tabela 5, agitados em vórtex por 10 s seguido de repouso por 10 min. Após esse tempo a amostra foi novamente centrifugada e uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi transferida para tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL, evaporada até securo a aproximadamente 45°C sob fluxo suave de nitrogênio. O extrato seco foi então reconstituído com acetonitrila:água (1:3, v/v) (solvente de diluição), agitado em vórtex por 15 s e filtrado com filtro de 0,22 µm para vial âmbar.

Este procedimento está exposto no fluxograma da Figura 5.

3.2.7.3 Preparo de amostras brancas de leite (ACC)

São amostras de leite isentas dos analitos alvo e sem o padrão interno.

A - Método direto

Estas amostras foram preparadas pipetando-se 2 mL de leite comprovadamente branco para um tubo de centrífuga de 50 mL, adicionados 100 µL de acetonitrila:água (1:3, v/v), e agitado em vórtex por 10 s. Após repouso de 10 min, foi dado prosseguimento conforme descrito na seção 3.2.6.2 A.

Este procedimento está exposto no fluxograma da Figura 3.

B - Método QuEChERS

Estas amostras foram preparadas pipetando-se 2 mL de leite comprovadamente branco para um tubo de centrífuga de 50 mL, adicionados 100 µL de acetonitrila:água (1:3, v/v), e agitado em vórtex por 10 s. Após repouso de 10 min, foi dado prosseguimento conforme descrito na seção 3.2.6.2 B.

Este procedimento está exposto no fluxograma da Figura 4.

C - Método QuEChERS com *clean-up* por d-SPE

Estas amostras foram preparadas pipetando-se 2 mL de leite comprovadamente branco para um tubo de centrífuga de 50 mL, adicionados 100 µL de acetonitrila:água (1:3, v/v), e agitado em vórtex por 10 s. Após repouso de 10 min, foi dado prosseguimento conforme descrito na seção 3.2.6.2 C.

Este procedimento está exposto no fluxograma da Figura 5.

3.2.7.4 Amostras de leite fortificadas no início do procedimento nos níveis de 0,125 LMR/ 0,5 LOQ a 3LMR/ 4LOQ para os métodos direto e QuEChERS com e sem *clean-up* por d-SPE

São amostras de leite fortificadas antes da etapa de extração. Estas amostras foram preparadas fortificando-se amostras brancas com os analitos alvo nas

concentrações de 6,25 a 150 ng/mL para TIL, e OLE; 5 a 120 ng/mL para ERI; 25 a 600 ng/mL para ESPI e 5 a 40 ng/mL para CLARI, TROL,. ROXI foi empregada como padrão interno a 50 ng/mL.

Para o preparo de tais amostras, foram pipetados 2 mL de leite branco para tubo de centrífuga de 50 mL, adicionados 50 µL da solução do padrão interno (ROXI a 50 ng/mL) e 50 µL da solução padrão de macrolídeos para cada nível de concentração preparadas conforme a seção 3.2.7.1, alíneas b) a i) (P1 ao P8).

Uma amostra branca contendo somente o padrão interno também foi preparada pipetando-se 2 mL de leite, adicionada de 50 µL de acetona:água (1:3, v/v) e 50 µL da solução do padrão interno (ROXI a 50ng/mL), agitada por 10 s e após 10 min de repouso foi dado prosseguimento ao processo de extração conforme descrito nas seções 3.2.7.2 A a 3.2.7.2 C.

Estes procedimentos estão expostos nos fluxogramas das Figuras 3, 4 e 5.

3.2.7.5 Preparo das soluções de fortificação no final do procedimento

A - Método direto

As soluções de fortificação no final do procedimento foram preparadas em acetona:água (1:3, v/v) nas seguintes concentrações:

- a) **P0** - solução de roxitromicina (padrão interno) a 5 ng/mL.
- b) **P1** - solução dos analitos alvo a 0,5 ng/mL para ERI; 0,625 ng/mL para TIL, e OLE; 2,5 ng/mL para ESPI e 0,5 ng/mL para CLARI, TROL, equivalente a 0,125 LMR / 0,5 LQ.
- c) **P2** - solução dos analitos alvo a 1 ng/mL ERI; 1,25 µg/mL TIL, OLE; 5 ng/mL ESPI; 1 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 0,25 LMR / 1 LQ.
- d) **P3** - solução dos analitos alvo a 2 ng/mL ERI; 2,5 ng/mL TIL, OLE; 10 ng/mL ESPI; 1,5 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 0,5 LMR / 1,5 LQ.
- e) **P4** - solução dos analitos alvo a 4 ng/mL ERI; 5 ng/mL TIL, OLE; 20 ng/mL ESPI; 2 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 1 LMR / 2 LQ.
- f) **P5** - solução dos analitos alvo a 6 ng/mL ERI; 7,5 ng/mL TIL, OLE; 30 ng/mL ESPI; 2,5 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 1,5 LMR / 2,5 LQ.

- g) **P6** - solução dos analitos alvo a 8 ng/mL ERI; 10 ng/mL TIL, OLE; 40 ng/mL ESPI; 3 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 2 LMR / 3 LQ.
- h) **P7** - solução dos analitos alvo a 10 ng/mL ERI; 12,5 ng/mL TIL, OLE; 50 ng/mL ESPI; 3,5 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 2,5 LMR / 3,5 LQ.
- i) **P8** - solução dos analitos alvo a 12 ng/mL ERI; 15 ng/mL TIL, OLE; 60 ng/mL ESPI; 4 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 3 LMR / 4 LQ.

B - Método QuEChERS com e sem *clean-up* por d-SPE

As soluções de fortificação no final do procedimento foram preparadas em acetonitrila:água (1:3, v/v) nas seguintes concentrações:

- a) **P0** - solução de roxitromicina (padrão interno) a 6,25 ng/mL.
- b) **P1** - solução dos analitos alvo a 0,625 ng/mL para ERI; 0,78125 ng/mL para TIL, e OLE; 3,125 ng/mL para ESPI e 0,625 ng/mL para CLARI, TROL, equivalente a 0,125 LMR / 0,5 LQ.
- c) **P2** - solução dos analitos alvo a 1,25 ng/mL ERI; 1,5625 µg/mL TIL, OLE; 6,25 ng/mL ESPI; 1 ng/mL CLARI, , TROL, equivalente a 1,25 LMR / 1 LQ.
- d) **P3** - solução dos analitos alvo a 2,5 ng/mL ERI; 3,125 ng/mL TIL, OLE; 12,5 ng/mL ESPI; 1,875 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 0,5 LMR / 1,5 LQ.
- e) **P4** - solução dos analitos alvo a 5 ng/mL ERI; 6,25 ng/mL TIL, OLE; 25 ng/mL ESPI; 2,5 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 1 LMR / 2 LQ.
- f) **P5** - solução dos analitos alvo a 7,5 ng/mL ERI; 9,375 ng/mL TIL, OLE; 37,5 ng/mL ESPI; 3,125 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 1,5 LMR / 2,5 LQ.
- g) **P6** - solução dos analitos alvo a 10 ng/mL ERI; 12,5 ng/mL TIL, OLE; 50 ng/mL ESPI; 3,75 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 2 LMR / 3 LQ.
- h) **P7** - solução dos analitos alvo a 12,5 ng/mL ERI; 15,625 ng/mL TIL, OLE; 62,5 ng/mL ESPI; 4,375 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 2,5 LMR / 3,5 LQ.
- i) **P8** - solução dos analitos alvo a 15 ng/mL ERI; 18,75 ng/mL TIL, OLE; 75 ng/mL ESPI; 5 ng/mL CLARI, TROL, equivalente a 3 LMR / 4 LQ.

3.2.7.6 Amostras de leite fortificadas no final do procedimento para os métodos direto e QuEChERS com e sem clean-up por d-SPE

São amostras já extraídas e evaporadas até a secura e fortificadas somente no final do procedimento, ou seja, após a etapa de evaporação.

Alíquotas de 500 µL dos extratos de amostras brancas (ACC) foram tomadas e os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL das soluções contendo os analitos alvo nas concentrações descritas nas seções 3.2.7.5 A (para o método direto) e 3.2.7.5 B (para os dois métodos QuEChERS) e então transferidos para vial âmbar.

Estes procedimentos estão expostos nos fluxogramas das Figuras 3, 4 e 5.

Figura 3: Fluxograma do método direto.

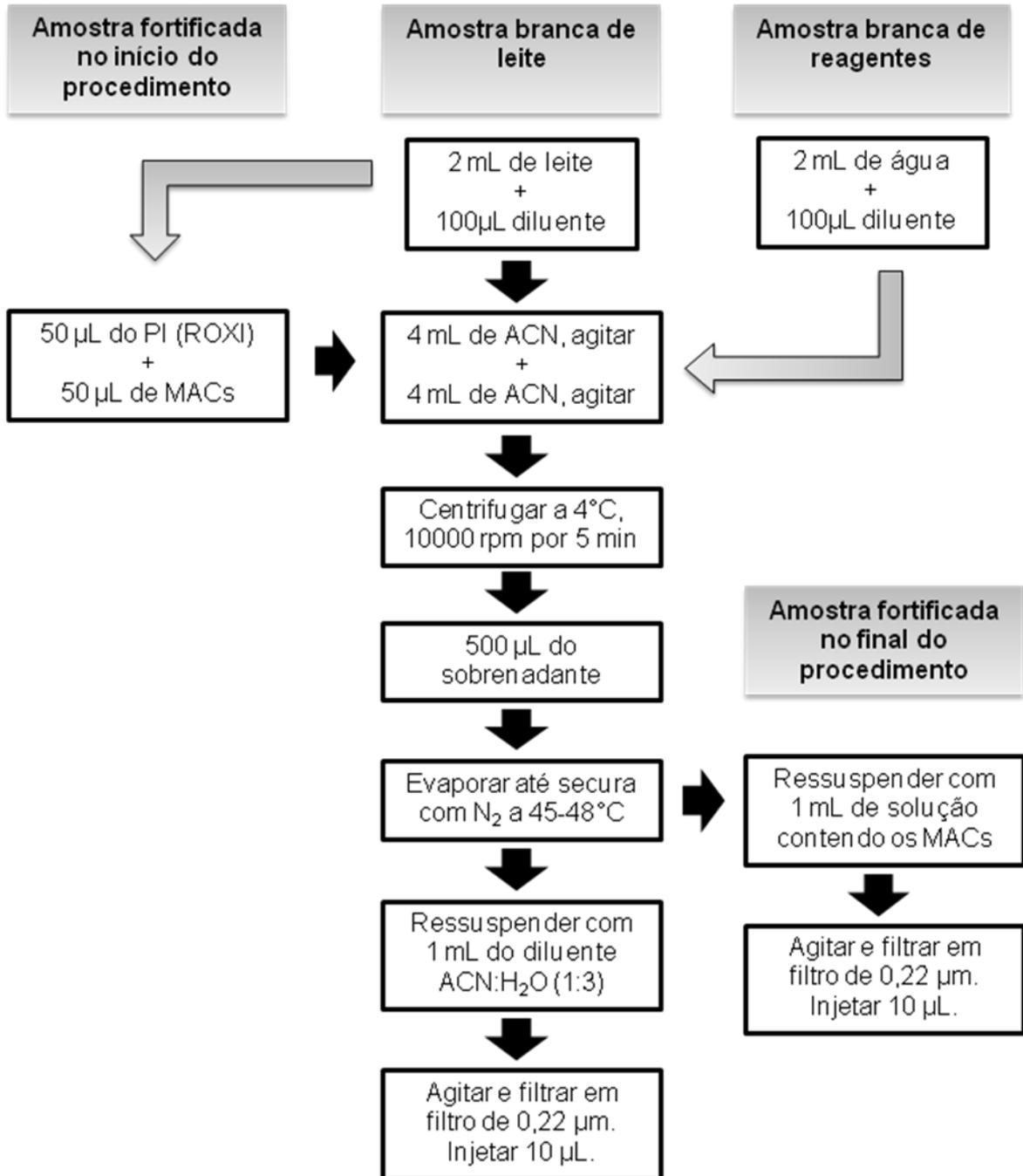


Figura 4: Fluxograma do método QuEChERS.

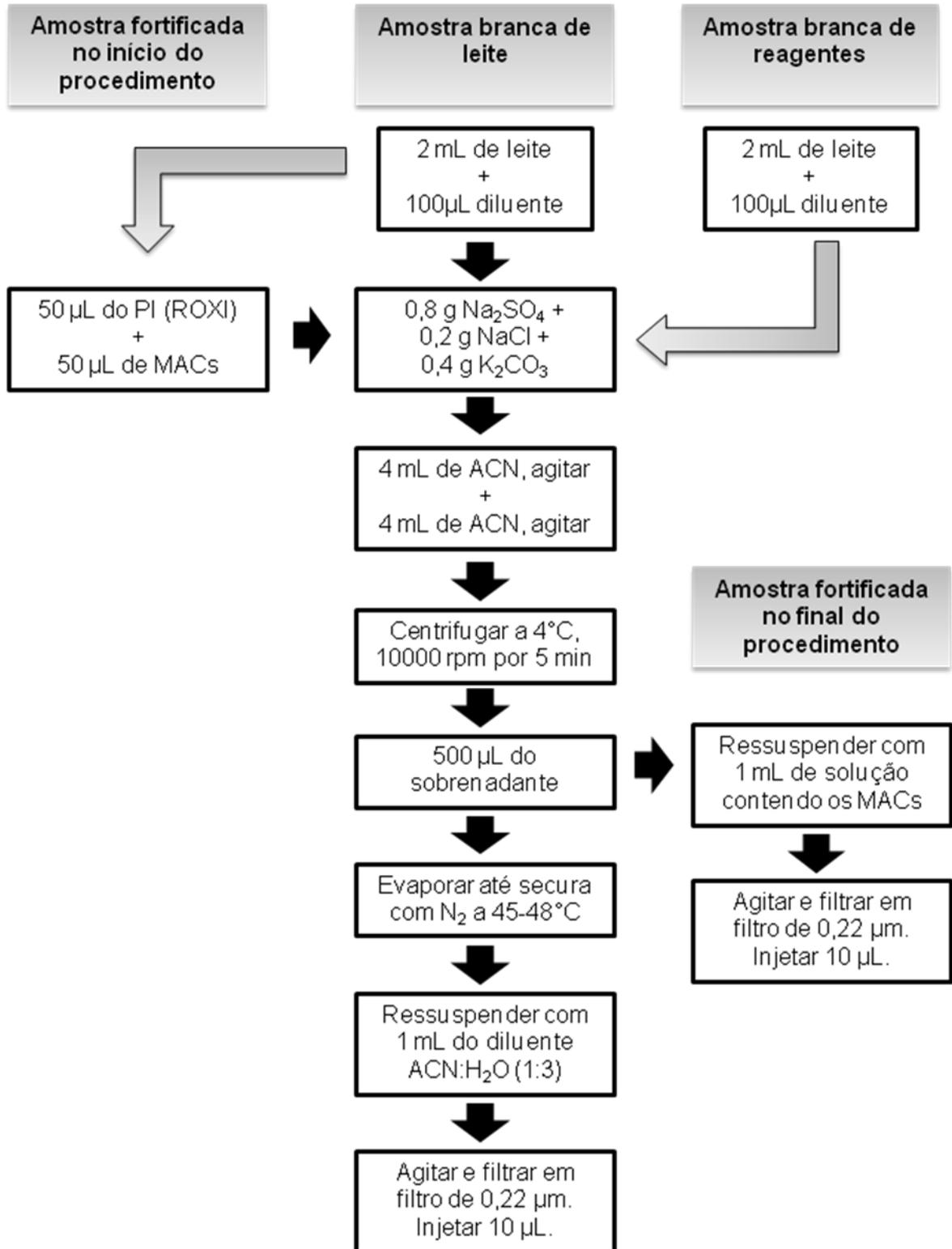
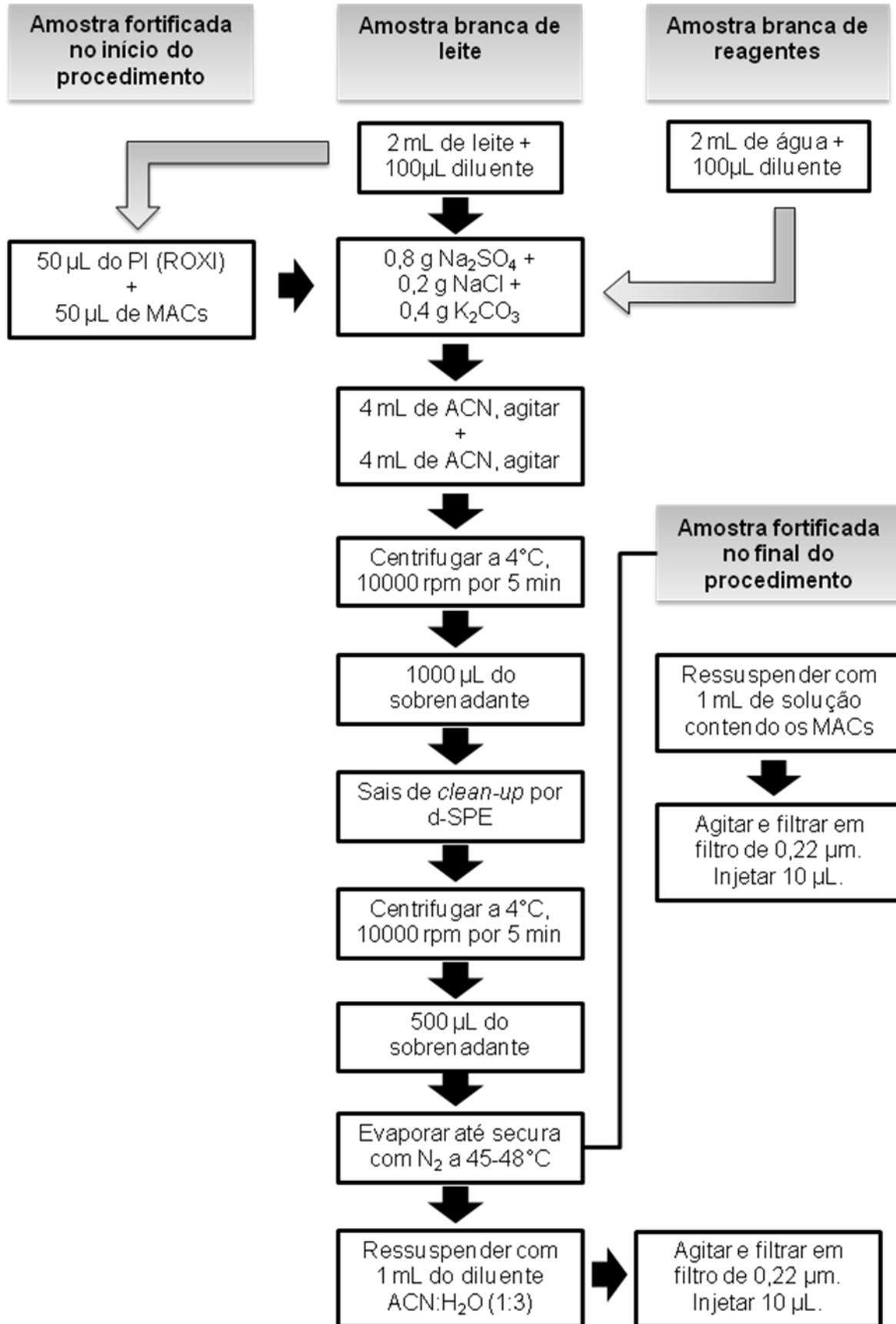


Figura 5: Fluxograma do método QuEChERS com clean-up por d-SPE



3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SELECIONADO

3.3.1 Seletividade

A seletividade do método QuEChERS desenvolvido nessa dissertação em relação a substâncias endógenas da matriz foi avaliada aplicando-se o método às 41 amostras adquiridas (Tabela 4, seção 3.2.6) e verificando-se se os picos eventualmente presentes nos tempos de retenção esperados apresentavam uma razão sinal/ruído maior ou igual a 3 para a segunda transição mais intensa monitorada, podendo assim serem considerados detectados. Dos leites comprovadamente isentos dos analitos alvo foram selecionados 8 (2 de cada tipo de leite) para a realização do teste de seletividade para a avaliação do efeito matriz relativo. As oito amostras brancas selecionadas, representativas de diferentes fontes de matriz, foram analisadas através da construção de curvas de calibração com a adição dos analitos no final do procedimento, ou seja, no momento da ressuspensão do extrato seco. As amostras foram fortificadas com a tilosina nas concentrações equivalentes a 0,25 a 2,5 vezes o LMR, além do ponto zero, com adição somente do padrão interno roxitromicina. Para a construção das 8 curvas de calibração os extratos provenientes do método QuEChERS desenvolvido foram injetados em triplicata aleatória. Através do software Analyst[®] as curvas foram contruídas utilizando-se o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$.

3.3.2 Intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração) instrumental

Para a avaliação do intervalo de medição e intervalo linear foram preparadas no solvente de reconstituição acetonitrila:água (1:3, v/v) quatro curvas de calibração, em dias diferentes, com oito concentrações (incluídas no intervalo de trabalho), além do zero. As concentrações da tilosina foram equivalentes a 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 vezes o LMR. Estas soluções foram injetadas em triplicata aleatória.

Considerando que em sistemas de espectrometria de massas triplo quadrupolar o limite de quantificação do instrumento equivale à concentração que fornece picos nas transições de quantificação e de confirmação com uma relação

sinal/ruído maior ou igual a 10, somente picos que atendem a essa relação foram considerados.

A presença de valores aberrantes em cada conjunto de repetições em cada nível foi verificada pelo teste de *Grubbs*, para um nível de significância (α) de 0,01, considerando que os dados são provenientes de uma distribuição normal.

A avaliação quanto à homocedasticidade dos dados, ou seja, se as variâncias são constantes ao longo do intervalo de medição, foi realizada através do teste de Levene, no software *Statistica Trial 10*. O teste de Levene é muito usado quando não se tem forte evidência de que os dados são provenientes de uma distribuição normal, sendo, portanto, um teste menos sensível à premissa da normalidade.

3.3.3 Linearidade, sensibilidade e efeito matriz absoluto

Uma amostra de leite UAT (052/13), uma das oito amostras comprovadamente brancas, foi selecionada para a construção das curvas de calibração fortificadas no início e no final do procedimento para fins de quantificação de todas as amostras usadas na avaliação dos parâmetros de validação.

Para a avaliação da linearidade e sensibilidade do método foi construída uma curva de calibração na matriz (amostra 052/13) com nove concentrações, incluindo o zero. Foram avaliadas também curvas de calibração com fortificação no final do procedimento, ou seja, após a etapa da evaporação.

O efeito matriz absoluto do método em relação aos fenômenos de supressão e ganho de sinal durante a ionização com o uso da técnica de LC-MS/MS foi avaliado comparando-se estatisticamente a curva de calibração preparada no diluente com a curva preparada na matriz com fortificação no final do procedimento de extração.

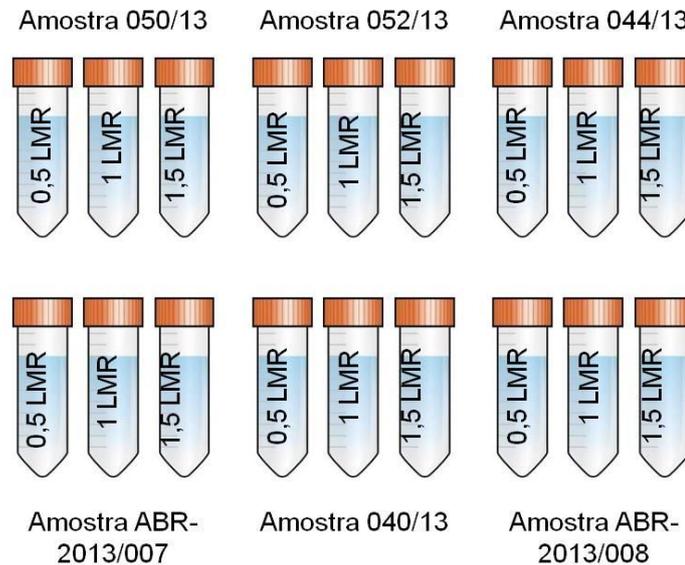
Todas as injeções foram realizadas em triplicata aleatória.

3.3.4 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada através da fortificação de seis das oito amostras de leite empregadas na avaliação do efeito matriz relativo. A fortificação foi feita no início do procedimento, nos níveis de concentração de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR

(Figura 6). O conjunto de seis diferentes amostras brancas de diferentes fontes de matriz foi selecionado entre aquelas já avaliadas no estudo da seletividade

Figura 6: Amostras selecionadas para a avaliação da repetibilidade do método.



Leite UAT: 050/13 e 052/13, leite em pó: 044/13 e ABR-13/007; leite pasteurizado: 040/13 e leite cru: ABR-2013/008.

Foram também preparadas e analisadas um pool das seis amostras brancas selecionadas, uma amostra branca de leite (ACC) e uma branca de reagentes (ACBR) conforme as seções 3.2.7.3 B e 3.2.7.2 B.

Para a quantificação das 18 amostras fortificadas no início do procedimento (Figura 6) e cálculo da recuperação (seção 3.2.7.4) foram construídas curvas de calibração na matriz (leite UAT integral 052/13), com fortificação no início do procedimento, com sete níveis de concentração, incluindo o zero, com adição do padrão interno qualitativo roxitromicina. As concentrações foram equivalentes a 0,25 a 2,5 vezes o LMR (12,5 a 125ng/mL de tilosina).

Todas as amostras foram preparadas em mais dois outros dias (total de três dias) consecutivos pelo mesmo operador e injetadas em triplicata aleatória.

3.3.5 Precisão Intermediária

Para a avaliação da precisão intermediária foram utilizadas as mesmas seis amostras brancas usadas no estudo da repetibilidade fortificadas nos mesmos níveis

de concentração (0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR). Foram também preparados um pool das seis amostras, uma amostra branca de leite (ACC) e uma amostra branca de reagentes.

Para a quantificação das 18 amostras fortificadas e cálculo da recuperação (seção 1.15.12) foram construídas curvas de calibração com fortificação no início do procedimento utilizando-se para tal o mesmo leite nas mesmas concentrações usadas no preparo desta mesma curva no estudo da repetibilidade (amostra 052/13).

A fim de se calcular a eficiência da extração / purificação das 18 amostras fortificadas foi construída também uma curva de calibração com fortificação no final do procedimento, da mesma forma descrita para as amostras da repetibilidade.

Todas as amostras foram injetadas em triplicata aleatória.

Este procedimento foi repetido por três dias, porém com quatro diferentes operadores segundo Tabela 6.

Tabela 6: Etapas executadas por diferentes operadores na avaliação da precisão intermediária.

DIA	OPERADOR	ETAPA EXECUTADA
1º	1	Fortificação
	2	Extração
2º	3	Fortificação
	1	Extração
3º	4	Fortificação
	2	Extração

3.3.6 Recuperação e eficiência da extração/purificação

3.3.6.1 Recuperação

Devido à falta de disponibilidade de MRC de macrolídeos em leite, o estudo da veracidade através da avaliação da recuperação foi possível através da fortificação de amostras brancas com solução de tilosina. Para isto, foram utilizadas as mesmas amostras fortificadas no início do procedimento nos níveis correspondentes a 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR (25, 50 e 75 ng/mL, respectivamente) usadas no teste de repetibilidade e precisão intermediária.

As amostras fortificadas foram quantificadas em curvas de calibração na matriz leite (amostra 052/13) com fortificação antes do procedimento de extração

nas concentrações de 6,25 ng/mL a 125 ng/mL (equivalentes a 0,25 LMR a 2,5LMR), além do ponto zero, todos com adição do padrão interno roxitromicina (ROXI).

As injeções foram efetuadas em triplicata aleatória.

A presença de valores aberrantes em cada nível foi avaliada pelo teste de *Grubbs* no nível de significância de $\alpha = 0,01$.

A recuperação média e o desvio padrão relativo (RSD) de cada nível dos seis resultados obtidos foram calculados, assim como os valores globais.

A recuperação foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{\text{exp/Fl}}}{C_t} \times 100$$

Onde,

$C_{\text{exp/Fl}}$ = concentração média das amostras fortificadas em curvas de calibração na matriz com fortificação no início do procedimento;

C_t = concentração teórica.

3.3.6.2 Eficiência da extração / purificação

A eficiência da extração também foi avaliada com as mesmas amostras fortificadas no início do procedimento nas mesmas concentrações usadas no estudo de repetibilidade, porém as amostras foram quantificadas em curvas de calibração na matriz (amostra 052/13) fortificadas após a etapa da extração, ou seja, após a evaporação as amostras foram ressuspensas com soluções contendo tilosina nas concentrações de 1,56 ng/mL a 15,625 ng/mL.

Foi avaliada a presença de valores aberrantes em cada nível pelo teste de *Grubbs* no nível de significância de $\alpha = 0,01$.

A eficiência da extração / purificação média e o desvio padrão (RSD) dos seis resultados de cada nível foram calculados, assim como os valores globais.

A eficiência da extração / purificação foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ Eficiência da extração} = \frac{C_{\text{exp/FF}}}{C_t} \times 100$$

Onde,

$C_{exp/FF}$ = concentração média das amostras fortificadas em curvas de calibração na matriz com fortificação no final do procedimento;

C_t = concentração teórica.

3.3.7 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

O limite de decisão e a capacidade de detecção do método foram calculados a partir dos dados provenientes da precisão intermediária (18 amostras com fortificação no início do procedimento nos níveis correspondentes a 0,5, 1 e 1,5 LMR da tilosina), ou seja, com 18 replicatas no nível 0,5 LMR, 18 replicatas no nível 1 LMR e 18 replicatas no nível 1,5 LMR, totalizando 54 amostras.

Para substâncias com limite permitido estabelecido, o limite de decisão ($\alpha=0,05$) é igual à concentração que corresponde a esse limite somado de 1,64 vezes o desvio padrão da precisão intermediária, enquanto a capacidade de detecção ($\beta=0,05$) é igual à concentração que corresponde ao valor do limite de decisão somado de 1,64 vezes o desvio da precisão intermediária.

3.3.8 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram avaliados a partir dos dados da precisão intermediária onde foram analisadas 18 amostras em três dias diferentes fortificadas no menor nível estudado, ou seja, na concentração equivalente a 0,5 LMR.

3.3.8.1 Limite de detecção (LOD)

Para o cálculo do limite de detecção foram considerados os picos com razão sinal/ruído ≥ 3 para a transição de confirmação. A razão sinal/ruído foi obtida pico por pico através da ferramenta *S-to-N Peak-to-Peak* do software Analyst®.

3.3.8.2 Limite de quantificação (LOQ)

Para o cálculo do limite de quantificação foram considerados os picos com razão sinal/ruído ≥ 10 para a transição de confirmação através da ferramenta *S-to-N Peak-to-Peak* do software Analyst®. O limite de quantificação do método foi considerado o limite inferior do intervalo de medição determinado de forma quantitativa com precisão e exatidão aceitáveis.

3.3.9 Estabilidade do analito

Como a estabilidade da tilosina em solução padrão não é conhecida, sua determinação foi feita através da comparação de soluções estoques recém preparadas com soluções estoques anteriormente preparadas e armazenadas a temperatura igual ou inferior a -70°C , segundo procedimento descrito no documento SANCO/12571/2013 (EUROPEAN COMMISSION, 2013).

A estabilidade é calculada em função da diferença percentual relativa (DPR) das respostas para soluções padrão de concentrações comparáveis, onde a DPR não deve ultrapassar 15%, segundo critério adotado no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do INCQS (INCQS, 2013).

Foram comparadas soluções diluídas de soluções estoque preparadas nos anos de 2010 e dois preparos no ano de 2013 (2013A e 2013B) armazenadas em temperatura inferior a -70°C através da fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{| \text{FR1} - \text{FR2} |}{\left(\frac{\text{FR1} + \text{FR2}}{2} \right)} \times 100$$

Onde,

FR1 = fator de resposta (área / concentração) da solução estoque anterior;

FR2 = fator de resposta da solução estoque recém preparada.

3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA A AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA TILOSINA EM SOLUÇÃO E EM LEITES TERMICAMENTE PROCESSADOS

3.4.1 Preparo da solução padrão de tilosina para os tratamentos térmicos

A fim de avaliar o impacto das condições térmicas de processamento do leite sobre a tilosina em solução, uma solução a 50 ng/mL em água foi obtida por diluições sucessivas da solução estoque (concentração 1000 µg/mL).

3.4.2 Tratamento térmico da solução padrão de tilosina

Volumes de aproximadamente 25 mL da solução a 50 ng/mL de tilosina em água foram distribuídos em três frascos Nalgene® de polipropileno. Um frasco foi separado para uso como amostra controle (sem tratamento) enquanto os outros foram aquecidos às temperaturas de 62°C por 30 min e 75°C por 20 s empregando-se os banhos termostáticos YZ-220V (Zeferquim Comércio de Materiais de Lab. LTDA, Brasil) e 2866 (Thermo Scientific, EUA).

Para o monitoramento da temperatura da solução dentro do frasco foi feita uma perfuração na tampa para inserção de um termômetro de vidro calibrado.

3.4.3 Aquisição das amostras de leite

Para a aquisição das amostras foi feito contato com três produtores locais da cidade do Rio de Janeiro para a verificação quanto ao uso de antimicrobianos administrados via ração, para melhor eficiência alimentar ou outras vias, para o tratamento de infecções. Uma fazenda produtora de leite localizada na cidade de Seropédica – Rio de Janeiro foi selecionada uma vez que o produtor rural informou não ter administrado nenhum tipo de antimicrobiano aos seus animais nos últimos meses para o tratamento de doenças embora um antibiótico da classe dos ionóforos poliéteres (monensina) tenha sido usado como melhorador de desempenho através da ração usada (Geramilk – Presence®).

Cerca de vinte litros de leite cru recém-coletados no período da manhã foram adquiridos do produtor local e transferidos para frascos tipo Nalgene® de

polipropileno e imediatamente imersos em gelo (Figura 7). O leite foi transportado para a Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada em Pedra de Guaratiba – Rio de Janeiro, onde ficou armazenado em câmara fria até o dia posterior, quando então foi retirado para fortificação e processamentos térmicos.

Figura 7: Leites acondicionados em frascos Nalgene® para transporte.



3.4.4 Fortificação da amostra de leite

Um volume de dez litros do leite cru adquirido foi transferido para um recipiente para posterior fortificação e o restante foi separado e dividido para uso como amostra branca para cada tratamento térmico a ser realizado. Os dez litros foram fortificados com 10 mL de solução padrão de tilosina na concentração de 100 µg/mL em água, fornecendo uma amostra fortificada de concentração teórica de 100 ng/mL (equivalente a 2 LMR). A amostra foi homogeneizada por 10 min e posteriormente dividida segundo o processamento térmico a ser empregado (Tabela 7).

Tabela 7: Separação do leite para aplicação dos tratamentos térmicos.

Tratamento térmico	Volume de leite necessário	
Pasteurização lenta	Amostra fortificada	2L
	Amostra branca	2L
Pasteurização rápida	Amostra fortificada	4L
	Amostra branca	4L

UAT	Amostra fortificada	4L
	Amostra branca	4L

3.4.5 Processamentos térmicos efetuados no leite

Os processamentos térmicos efetuados simularam aqueles autorizados no país: pasteurização lenta (64°C por 30 min), pasteurização rápida (78°C por 30 s) e tratamento à ultra alta temperatura (128°C por 4 s).

Os tratamentos térmicos foram realizados na Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ na Planta Piloto de Operações Unitárias II. O equipamento utilizado foi um trocador de calor de superfície raspada da marca Armfield FT25D, onde foram realizadas a pasteurização rápida e o tratamento à ultra-alta temperatura (Figura 8). A execução da pasteurização lenta do leite foi possível através da imersão de dois frascos Nalgene®, um contendo o leite fortificado e outro o leite branco, em um recipiente em aço inox contendo água em seu interior. A tampa de um dos frascos foi perfurada de forma a permitir que um termômetro tipo termopar pudesse ser introduzido sem folga para o acompanhamento da temperatura do leite durante o tratamento. O recipiente inox com os dois frascos foi então aquecido sobre um fogão industrial até que as condições de pasteurização lenta pudessem ser reproduzidas (Figura 9).

Figura 8: Trocador de calor de superfície raspada usado na pasteurização rápida e tratamento UAT.



Fonte: imagem própria

Figura 9: Recipiente em aço inox usado na pasteurização lenta.



Fonte: imagem própria

3.4.6 Análise das soluções padrão de tilosina

Após a finalização dos tratamentos térmicos descritos na seção 3.4.5, todas as soluções (inclusive aquela não tratada termicamente) foram diluídas até concentração de 12,5 ng/mL cada, de forma a poder ser quantificada dentro do intervalo de medição linear do método desenvolvido por LC-MS/MS. A fim de se obter na solução final a mesma proporção de acetonitrila:água usada no preparo da curva de calibração no diluente, ou seja, acetonitrila:água (1:3, v/v), uma alíquota de 250 μ L da solução a 50 ng/mL foi tomada e diluída em 500 μ L de água e 250 μ L de acetonitrila.

Para a quantificação das soluções padrão de tilosina fortificadas e submetidas aos tratamentos térmicos, uma curva de calibração foi preparada nas concentrações de 1,56 a 15,625 ng/mL no mesmo diluente das amostras. A curva foi injetada em triplicata, assim como cada amostra:

- solução sem aquecimento;
- solução após pasteurização lenta e,
- solução após pasteurização rápida.

Uma nova diluição das amostras foi feita e injetada na mesma curva preparada anteriormente para confirmação do resultado.

A fim de identificar possíveis produtos de degradação, as soluções padrão de tilosina tratadas e não tratadas termicamente foram também analisadas por LC-Triplo-TOF/MS

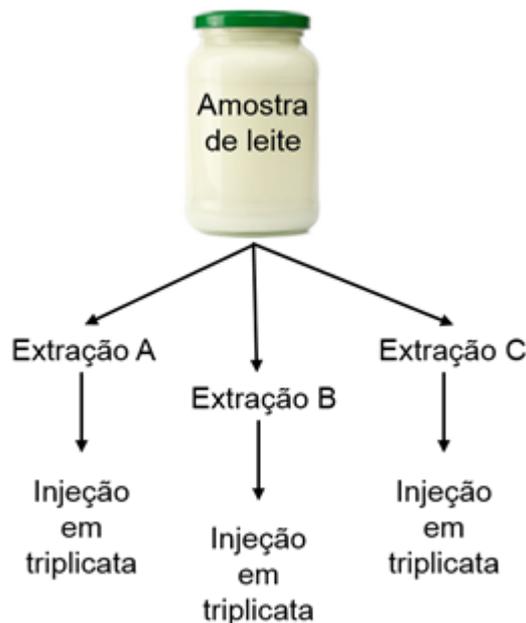
3.4.7 Preparo das amostras para quantificação pelo método validado

Foram realizadas três extrações em cada amostra de leite:

- leite fortificado sem nenhum tratamento térmico;
- leite fortificado submetido à pasteurização lenta;
- leite fortificado submetido à pasteurização rápida;
- leite fortificado submetido ao tratamento à ultra-alta temperatura (UAT);
- leite branco submetido à pasteurização lenta;
- leite branco submetido à pasteurização rápida e,
- leite branco submetido ao tratamento à ultra-alta temperatura (UAT).

Todas as amostras foram extraídas pelo método QuEChERS e injetadas em triplicata (Figura 10).

Figura 10: Preparo das amostras de leite para avaliação da estabilidade da tilosina.



Para a quantificação dessas amostras foi utilizada uma curva de calibração preparada na matriz (amostra 052/13) já que na etapa da validação verificou-se que as curvas de calibração na matriz não são equivalentes às curvas de calibração preparadas no diluente sendo, portanto, necessária uma curva matrizada para a quantificação de amostras de leite.

Para o monitoramento da qualidade das análises (controle do processo) foram também preparadas:

- uma amostra controle branco de leite (ACC) a fim de confirmar que a amostra já avaliada como isenta das substâncias pesquisadas não sofreu nenhum tipo de contaminação ao longo da análise. É feita então a verificação do cromatograma do extrato do leite usado para o preparo da curva de calibração (amostra 052/13) de forma a atestar que não há picos das transições de quantificação e confirmação na região de eluição do analito;

- uma amostra controle branco de reagentes (ACBR) para verificar que não tenha havido nenhum tipo de contaminação com os reagentes usados ao longo da análise.

- duas amostras controles não conformes (ACNC) no nível equivalente a 1LMR para verificação do desempenho do método. Essas amostras foram preparadas através da fortificação do leite com o padrão interno qualitativo roxitromicina (50 ng/mL) e o analito alvo tilosina a 100 ng/mL, extraídas e reconstituídas com o solvente de reconstituição.

- uma amostra controle não conforme com fortificação no final do procedimento (ACNCFF) no nível equivalente a 1LMR para cálculo da recuperação do analito.

A verificação da presença de possíveis produtos de degradação nos leites por LC-TOF/MS não foi realizada, pois a amostra controle (leite fortificado sem a aplicação do tratamento térmico) não pôde ser analisada nesta ocasião.

3.4.8 Procedimentos para a avaliação dos resultados dos testes de estabilidade da tilosina por LC-MS/MS em leites termicamente processados

Para avaliar os resultados, utilizou-se como referência uma amostra de leite não tratada termicamente fortificada a uma concentração de 100 ng/mL (equivalente a 2LMR) de tilosina (amostra controle). A concentração resultante da extração desta

amostra foi comparada com as concentrações de tilosina resultantes das amostras de leite fortificadas na mesma concentração após os tratamentos térmicos.

A porcentagem de degradação foi calculada a partir da equação:

$$\% \text{ de degradação} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

Onde:

C_0 é a concentração inicial e,

C é a concentração final

Os resultados obtidos foram avaliados através de testes estatísticos a fim de se comparar as amostras quanto à concentração de tilosina encontrada antes e após os tratamentos térmicos empregados.

3.4.8.1 Teste de Grubbs

O teste de Grubbs foi efetuado em cada amostra de leite em cada conjunto de extrações para o nível de significância de $\alpha=0,01$, a fim de verificar a presença de possíveis resultados que aparentemente diferem dos demais, partindo da premissa que os dados são provenientes de uma distribuição normal.

Valores extremos podem ser subdivididos em *stragglers* (extremos), ou seja, valores extremos detectados entre 95% e 99% de nível de confiança, e *outliers* (aberrantes), valores extremos a um nível de confiança maior que 99% (ISO, 1994).

Foram testadas quanto à presença de *outliers* as concentrações encontradas resultantes da injeção em triplicata de cada uma das três extrações das amostras, totalizando nove resultados para cada amostra:

- leite fortificado sem nenhum tipo de tratamento térmico,
- leite fortificado após processo de pasteurização lenta;
- leite fortificado após processo de pasteurização rápida;
- leite fortificado após processo a ultra-alta temperatura.

Para testar a hipótese nula (H_0) de que todos os valores encontrados resultantes de uma mesma extração pertencem à mesma população, o valor de G foi calculado através da fórmula:

$$G = \frac{|\text{valor suspeito} - \text{média amostral}|}{\text{desvio padrão amostral}}$$

Onde, a média e o desvio padrão são calculados incluindo o valor suspeito.

Os valores foram considerados pertencentes a uma distribuição bi-caudal, o que é mais apropriado quando não se possui conhecimento de qual extremidade dos dados o *outlier* pode ocorrer.

O valor de G calculado foi comparado com o valor de G crítico (Tabelado) para um intervalo de confiança de 99% ($p=0,01$), ou seja, assumindo-se o risco de falsa rejeição de 1%. Quando o valor de G calculado é maior que o crítico, rejeita-se a hipótese nula e o valor suspeito é rejeitado.

3.4.8.2 Teste de Shapiro-Wilk

O teste de Shapiro-Wilk é um teste não-paramétrico de ajuste de modelo aplicado com a finalidade de verificar estatisticamente se os valores experimentais pertencem ou não a uma distribuição normal. Este teste é aconselhado para amostras de dimensão reduzida (menor que trinta).

Para testar a hipótese nula (H_0) de que os valores (concentração) encontrados para cada amostra pertencem a uma distribuição normal, a um intervalo de confiança de 95%, o teste de Shapiro-Wilk foi efetuado considerando os nove resultados (concentração de tilosina encontrada) em cada amostra de leite testada. A distribuição é considerada normal quando $p > 0,05$, caso contrário, a população atende a uma distribuição não normal.

3.4.8.3 Teste *t* (Student)

O teste *t* (Student) tem por finalidade comparar duas médias experimentais quando o desvio-padrão populacional é desconhecido. O teste *t* pode ser aplicado mesmo que para amostras pequenas, porém, considerando que estas são provenientes de populações que possuem distribuição normal.

Antes de empregar o teste *t*, deve-se usar o teste F Snedecor para decidir se as variâncias amostrais diferem ou não significativamente. O teste F é aplicado para testar a hipótese nula (H_0) de que as variâncias de duas amostras não são significativamente diferentes, consistindo, portanto, em uma comparação de desvios-padrão. Quando $p > 0,05$, a hipótese nula não é rejeitada, portanto assume-se que as variâncias amostrais são equivalentes. Nesse caso, deve-se aplicar o teste *t* assumindo que as variâncias são equivalentes. Caso contrário, se $p < 0,05$, deve-se aplicar o teste *t* assumindo-se que as variâncias não são equivalentes.

Os testes F e *t* foram aplicados sobre os resultados (concentração de tilosina) obtidos ($n=9$), a um nível de significância (α) de 0,05 onde as amostras foram comparadas da seguinte forma:

- amostra sem tratamento térmico x amostra submetida à pasteurização lenta;
- amostra sem tratamento térmico x amostra submetida à pasteurização rápida e,
- amostra sem tratamento térmico x amostra submetida à ultra-alta temperatura (UAT).

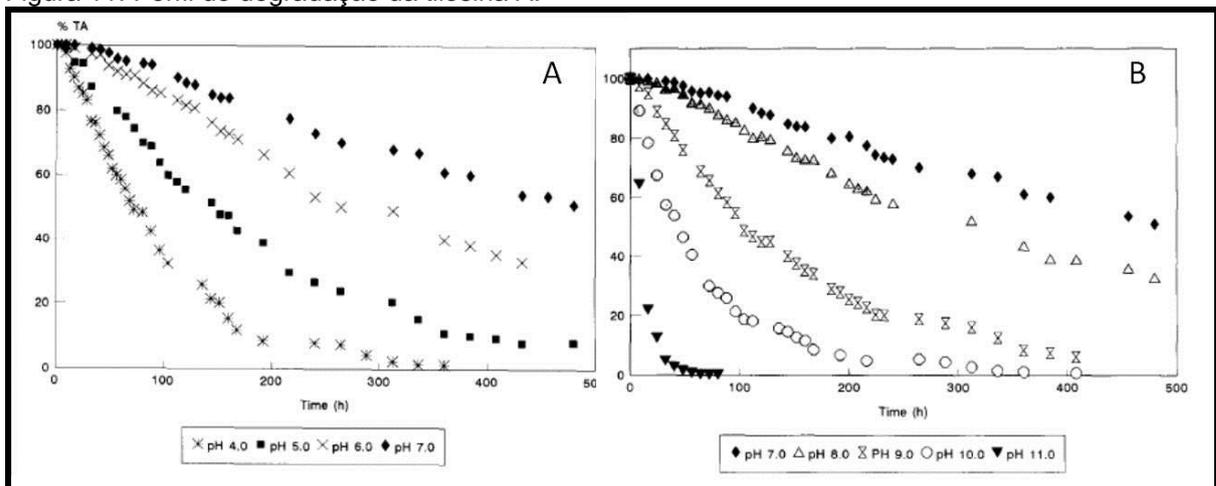
Quando $p < 0,05$ no teste *t*, assumiu-se que a diferença entre as médias amostrais são significativas. Nesse caso, foi calculada a porcentagem de degradação de tilosina observada. Quando $p > 0,05$, a diferença entre a concentração da tilosina antes e após o tratamento térmico em questão não é significativa, portanto, nenhuma degradação teria sido observada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de degradação da tilosina A

Paesen e colaboradores realizaram, em 1995, estudos sobre a taxa de decomposição da tilosina A por cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (CL-UV) variando-se o pH das soluções (pH entre 2 e 13) e as temperaturas de aquecimento (60, 70 e 80°C), dentre outros fatores. A Figura 11 demonstra o perfil de degradação da tilosina A observado nos meios ácido e alcalino à temperatura de 60°C.

Figura 11: Perfil de degradação da tilosina A.



Fonte: Paesen e col., 1995.

A: degradação em meio ácido; B: degradação em meio alcalino.

Neste estudo foi observado que em pH=4,0 a maior concentração de tilosina B, maior produto de degradação formado a partir da tilosina A por remoção do açúcar neutro micarose, foi obtida após 216 h (9 dias) à 60°C. Em meio neutro e alcalino, a tilosina A é decomposta em uma mistura complexa de tilosina aldol e diferentes produtos polares de identidades desconhecidas provavelmente decorrentes da abertura do anel lactona. Em relação à influência da temperatura na taxa de degradação, testes com soluções de pH= 4,0 e 9,0 às temperaturas de 60, 70 e 80°C foram realizados. Concluiu-se, neste teste, que quanto maior a temperatura, maior a taxa de degradação em ambos os valores de pH avaliados.

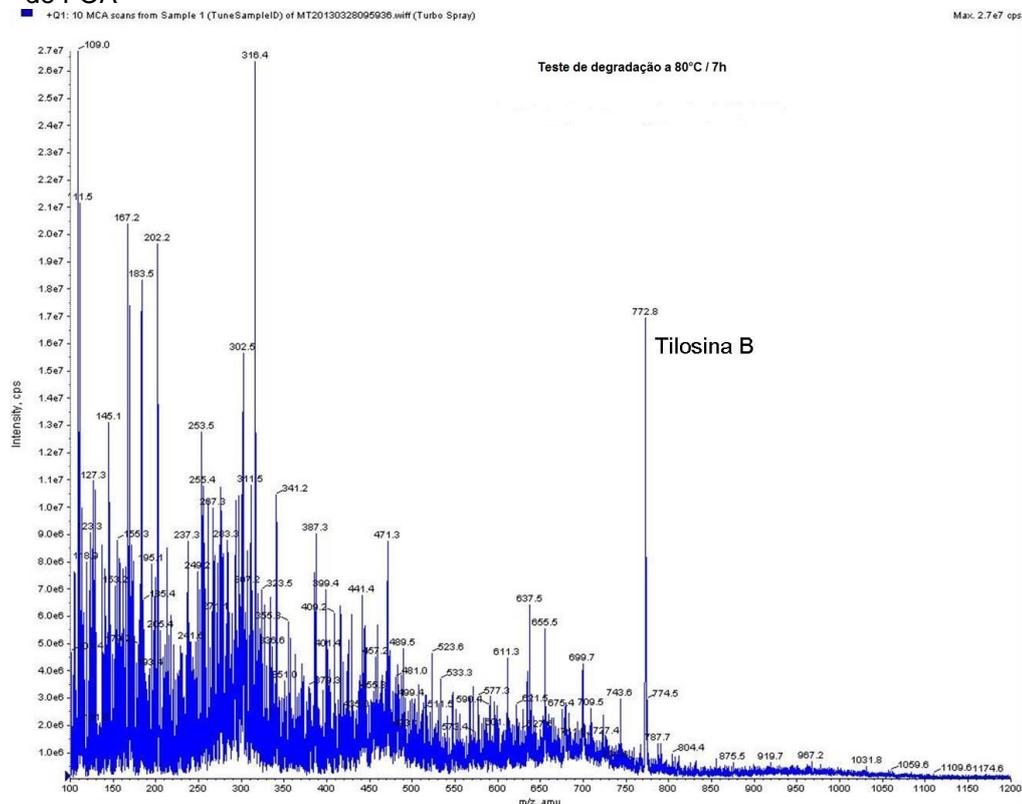
Cherlet e colaboradores (2002), relataram que a tilosina A degrada-se em $\text{pH} < 4$ e $\text{pH} > 9$, conforme foi descrito por Paesen e col. (1995).

Baseando-se nos dados descritos pelos autores acima citados, foi realizado um teste em laboratório a fim de se obter as tilosinas B, C e D a partir da degradação de uma solução padrão a 100 ng/mL de tilosina A em água em valores de pH de aproximadamente 2,0, 3,0, 4,0 e 7,0.

A temperatura de 80°C para a degradação da tilosina A foi eleita em função do estudo de Paesen e col. (1995), que concluiu que quanto maior a temperatura, maior a taxa de degradação da tilosina.

Após 7h e 14h de degradação foi feita a diluição necessária para a verificação da formação das tilosinas B, C e D através da injeção no espectrômetro de massas (API 5000, Applied Biosystems). O melhor resultado foi obtido no diluente ACN:H₂O (1:1, v/v) com 0,1% de FOA, após 7h de teste onde foi possível obter a tilosina B (Figura 12). A partir desse tempo observou-se uma redução na concentração da tilosina B.

Figura 12: Teste de degradação a 80°C por 7h em acetonitrila:água 1:1 com 0,1% de FOA

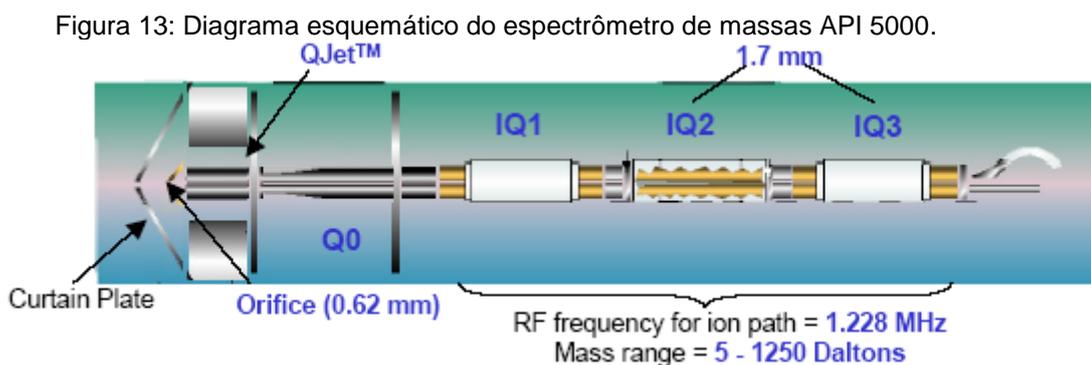


4.2 Otimização

A otimização consiste no ajuste dos parâmetros relativos à fonte de íons e dos parâmetros relativos aos analitos para maximizar a resposta do espectrômetro de massas para cada substância analisada.

O conhecimento das características físico-químicas dos macrolídeos é muito importante para o desenvolvimento de métodos analíticos que visam à determinação dessas substâncias nos alimentos. O modo eletrospray positivo foi escolhido em função dos macrolídeos possuírem um ou dois átomos de nitrogênio em suas moléculas sendo, portanto, facilmente protonáveis a íons com carga simples ($[M+H]^+$) ou dupla ($[M+2H]^{2+}$) (SISMOTTO e col., 2013). Os parâmetros dependentes do analito denominados *Declustering Potential* (DP), *Collision Energy* (CE) e *Collision Exit Potential* (CXP) controlam, respectivamente, a voltagem no orifício (que controla a habilidade de desagregar íons entre o orifício e a QJet), a energia de colisão (a diferença de potencial entre Q0 e Q2) e o potencial de saída da célula de colisão (SPISSO, B. F.; MONTEIRO, M. R., 2013).

A Figura 13 apresenta um diagrama esquemático do espectrômetro de massas API5000 (Applied Biosystems) empregado neste trabalho.



Fonte: <http://www.absciex.com/>

Como pode ser observado, o instrumento é constituído por três quadrupolos em série (Q1, Q2 e Q3), onde o primeiro quadrupolo é utilizado para isolar os íons de interesse gerados na fonte de íons, o segundo funciona como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação por dissociação induzida por colisão dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, e o terceiro estabelece uma relação entre o

íon de interesse e outros íons que foram gerados a partir de sua decomposição na cela de colisão.

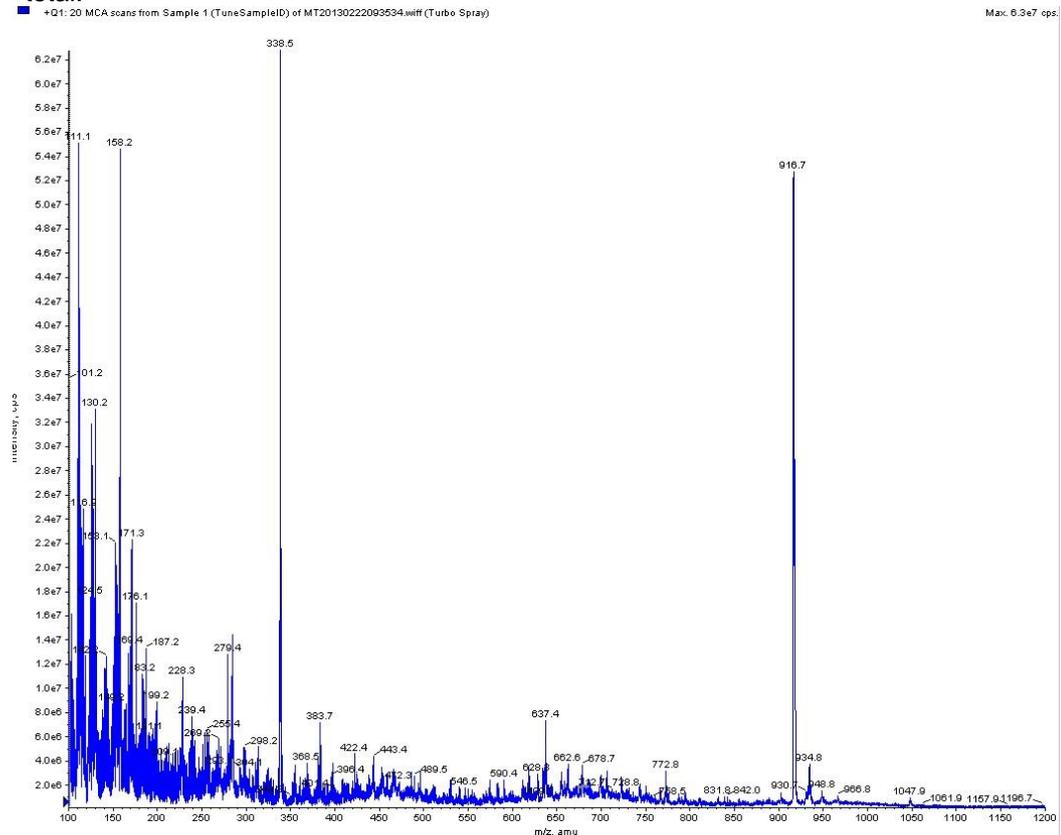
A otimização dos valores de DP, CE e CXP através da infusão direta da solução a 100ng/mL de tilosina em MeOH:H₂O com 0,1% de FOA e ACN:H₂O com 0,1% de FOA foi conseguida somente para as tilosinas A e C. A otimização da tilosina B foi possível através da infusão da solução do teste de degradação em ACN:H₂O com 0,1% de FOA descrito na seção anterior.

Nessa etapa diferentes modos de aquisição do espectrômetro de massas API 5000 foram empregados:

- Varredura total: com o objetivo de verificar se o analito de interesse ($[M+H]^{1+}$ e $[M+2H]^{2+}$) estava sendo detectado na concentração da solução padrão preparada. Foi feita uma varredura de 100 a 1200 unidades de massa (14), obtendo-se o espectro de massas total. Os macrolídeos tilosina A, tilosina B, troleandomicina, oleandomicina, eritromicina e claritromicina geraram somente a forma monoprotonada, pois possuem somente um átomo de nitrogênio em suas moléculas, enquanto a espiramicina, roxitromicina e tilmicosina, que possuem dois átomos de nitrogênio, geraram as duas formas, monoprotonada e duplamente protonada. Foi verificado ainda que a troleandomicina perde uma molécula de acetil durante a ionização, levando a formação da espécie $[M\text{-acetil}+H]^{1+}$.

A Figura 14 ilustra o espectro de massas da tilosina A no modo varredura total.

Figura 14: Espectro de massa da tilosina A (m/z 916) no modo de aquisição varredura total.



- Varredura de íons produtos: para identificar as transições a serem usadas para a posterior quantificação por MS/MS. Foi feita uma varredura de 50 a 1200 unidades de massa (Figura 15), obtendo-se o espectro de íons produtos. Foram selecionados os íons produtos de acordo com a sua abundância e íons característicos da classe. Algumas das possíveis rotas de fragmentação da tilosina A com formação de íons produtos encontrados neste trabalho estão dispostas na Figura 16.

Figura 15: Espectro de massa da tilosina A (m/z 916) no modo de aquisição varredura de íons produtos.

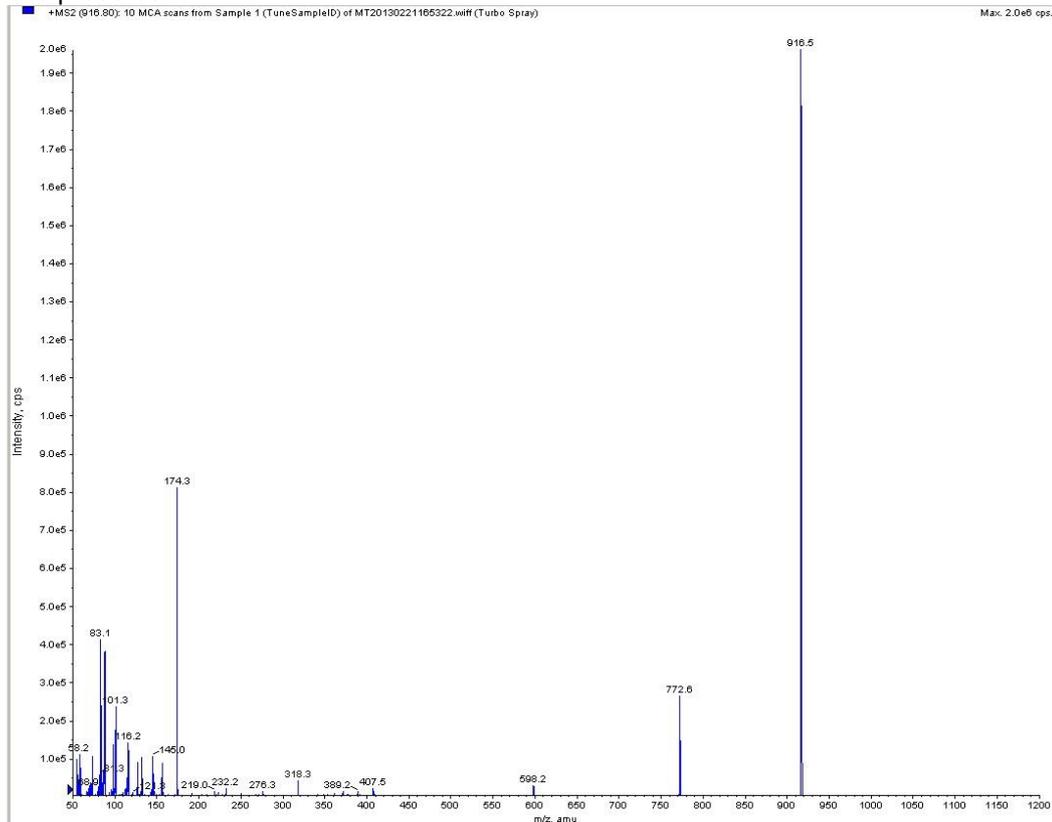
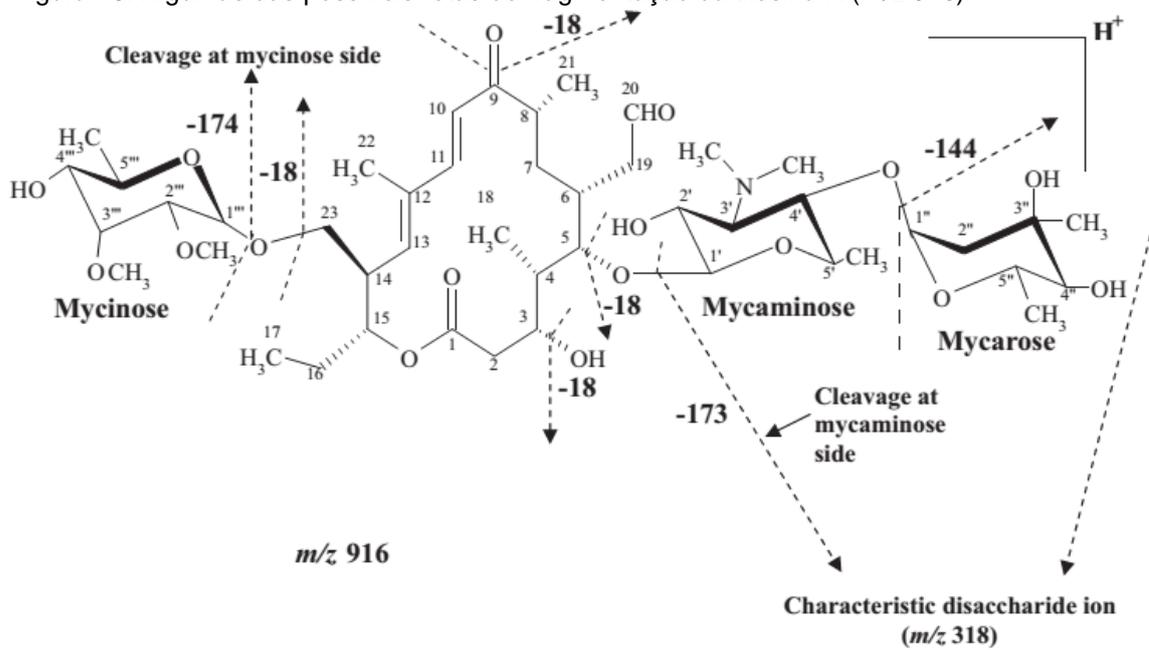


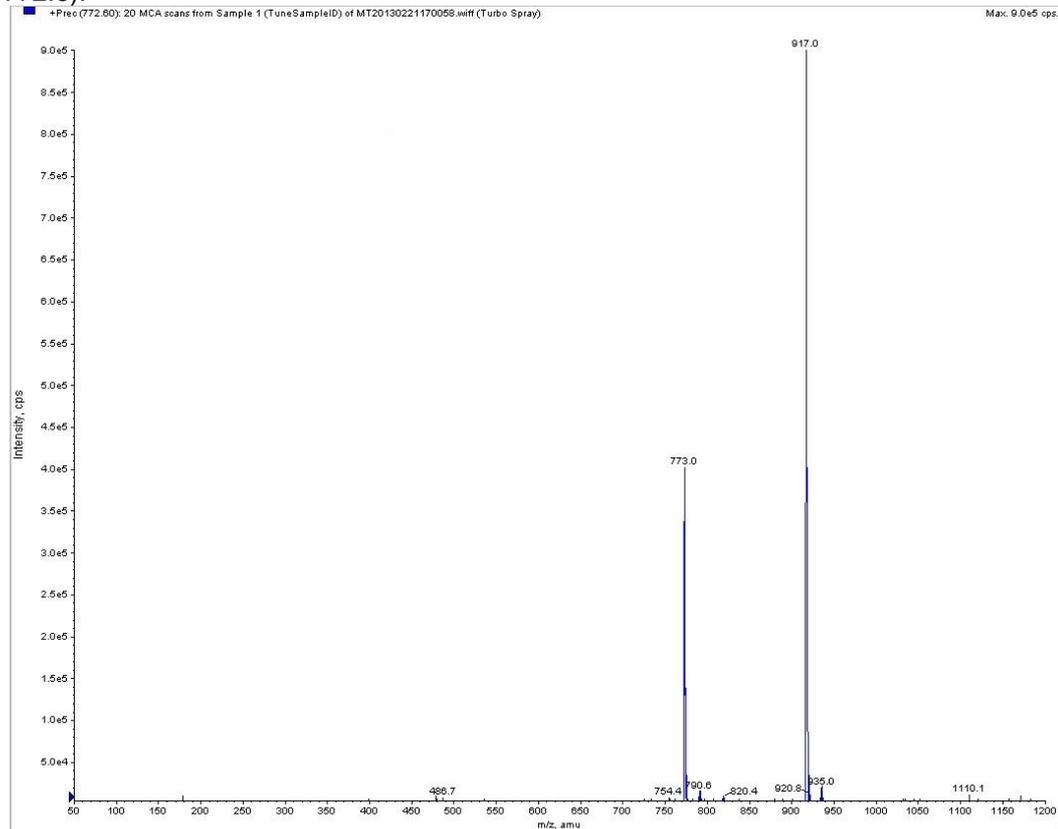
Figura 16: Algumas das possíveis rotas de fragmentação da tilosina A (m/z 916).



Fonte: CHOPRA e col., 2013.

- Varredura de íon precursor: para confirmar o íon de origem do fragmento selecionado (Figura 17). Foi feito para os principais íons produtos m/z 174.0, m/z 772.6 da tilosina, obtendo-se o espectro de íons precursores.

Figura 17: Espectro de massa no modo de aquisição varredura do íon precursor (m/z 772.6).



- Varredura de perdas neutras constantes: para verificar se há perda constante de uma parte neutra do composto. Nesse caso, todos os precursores que perdem uma parte neutra constante são monitorados. Esta característica é normalmente observada na análise de uma classe de substâncias. Não foram observadas perdas neutras constantes de $18u$ (H_2O) e $44u$ (CO_2).

- Monitoramento de reações múltiplas (MRM): utilizado para monitorar múltiplos íons produto provenientes da fragmentação de um ou mais íons precursores simultaneamente.

Para os demais macrolídeos empregados na avaliação da seletividade do método validado para a tilosina, somente os modos de aquisição de varredura no

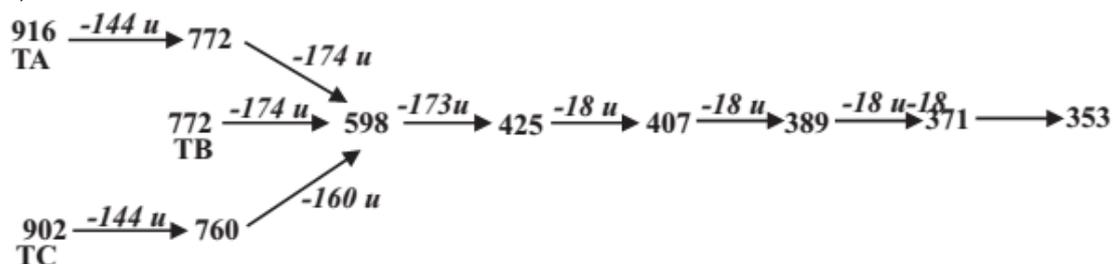
primeiro quadrupolo e MRM foram empregados. Os valores de DP, CE e CXP para as transições íon precursor/íons produto das tilosinas A, B e C obtidos no modo MRM encontram-se na Tabela 8. Os valores de DP, CE e CXP para os outros macrolídeos encontram-se na seção 4.3.2.

Tabela 8: Valores de DP, CE e CXP para as tilosinas A, B e C.

Analito	Íon precursor	Íon produto	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Tilosina A [M+H] ⁺	916,621	174,1	226	49	18
		772,4		39	24
		156,1		61	22
Tilosina B [M+H] ⁺	772,503	174,1	181	41	18
		156,0		51	18
		132,2		43	20
Tilosina C [M+H] ⁺	902.583	174.1	196	49	18
		145.2		45	10
		133.1		45	14

A Figura 18 abaixo ilustra possíveis rotas de fragmentação e formação dos íons produtos da tilosinas A (TA), tilosina B (TB) e tilosina C (TC).

Figura 18: Algumas das possíveis rotas de fragmentação da TA (m/z 916), TB (m/z 772) e TC (m/z 902).



Fonte: CHOPRA e col., 2013.

Na otimização dos parâmetros dependentes da fonte ESI, efetuada de forma manual, foram testados valores de *IonSpray Voltage* (IS) (voltagem aplicada à agulha que ioniza a amostra na fonte) de 3000V, 4000V, 5000V e 5500V, e valores de temperatura da probe na fonte APCI (TEM) (temperatura que ajuda na evaporação do solvente para produzir íons em fase gasosa) de 450, 500, 550 e 600°C, onde a melhor ionização das amostras ocorreu com IS de 5000V e TEM de 450°C.

4.3 Condições cromatográficas e espectrométricas desenvolvidas

4.3.1 Método cromatográfico para separação das tilosinas A, B e C

Como não foi possível obter as condições espectrométricas para a tilosina D, o desenvolvimento do método cromatográfico focou na capacidade de separação das tilosinas A, B e C.

A coluna cromatográfica Kinetex™ Phenomenex (C18, 2,6 μm , 50 x 2,10 mm), com partículas do tipo Core-Shell, permite obter alto desempenho, como a de um sistema Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) utilizando-se baixa pressão (menor que 400 bar = 6000 psi). Devido ao fato dessas partículas não serem totalmente porosas como as convencionais, ou seja, os analitos gastam menos tempo para se difundir para dentro e para fora dos poros durante sua passagem pela coluna. Embora a referida coluna tenha apresentado uma boa resolução dos picos, após várias tentativas não se obteve repetibilidade dos resultados, o que levou ao abandono dos testes nessa coluna. Este comportamento já havia sido observado no laboratório, onde este estudo foi realizado, durante o desenvolvimento de outro método cromatográfico para outra classe de substâncias.

A coluna Polaris® (C-18A, 3 μm , 100 mm x 2 mm) permitiu a obtenção de picos com alta resolução, sensibilidade e excelente reprodutibilidade de áreas, sendo portanto, eleita para o desenvolvimento do método cromatográfico.

A partir de um método cromatográfico pré-existente no laboratório, vários outros foram testados a fim de se obter a melhor separação da tilosina A e seus produtos de degradação (tilosinas B e C) no menor tempo total de corrida cromatográfica possível. Em relação à intensidade de sinal dos analitos, resolução e simetria dos picos e tempo total de corrida, o melhor programa de eluição e condições cromatográficas obtidos foram os dispostos nas Tabelas 9 e 10:

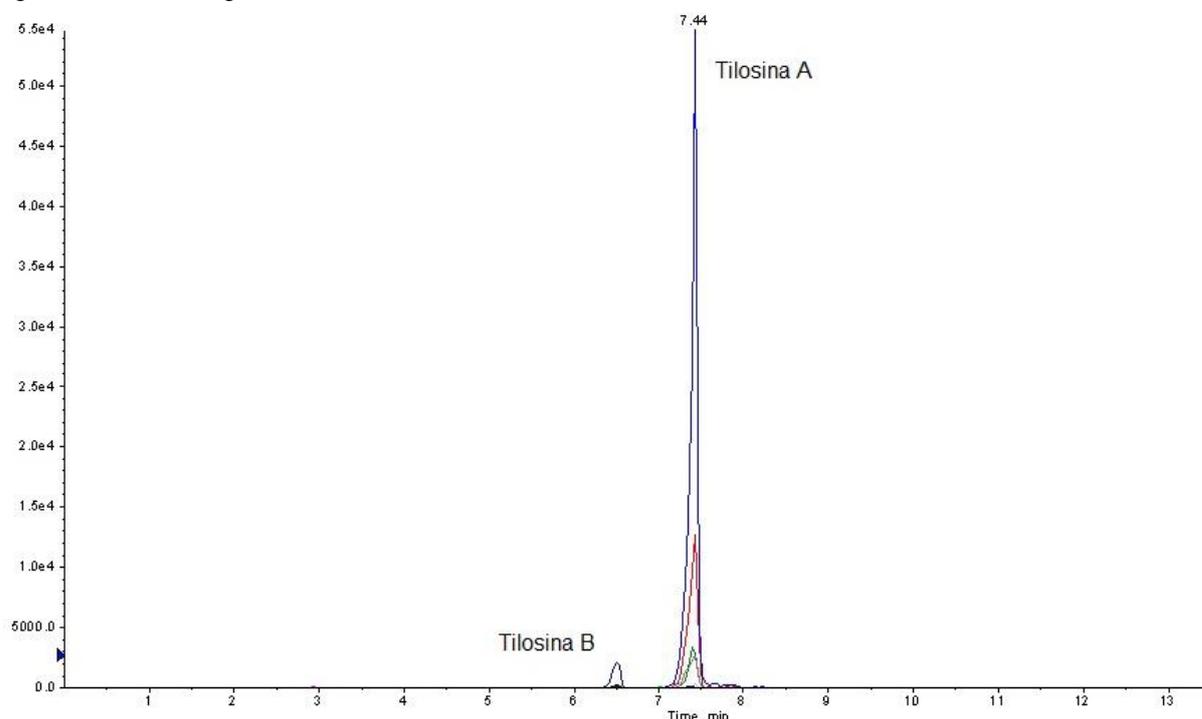
Tabela 9: Condições cromatográficas do método de separação das tilosinas A, B e C com coluna Polaris® (C-18A, 3 μm , 100 mm x 2 mm).

Fases móveis	Fluxo da fase móvel	Temperatura do forno	Tempo total de corrida
A: 0,1 % FOA em água	0,3 mL/minuto	40 °C	15 min
B: 0,1 % FOA em ACN			

Tabela 10: Programa de eluição gradiente para a separação das tilosinas A, B e C, em coluna Polaris® (C-18A, 3 µm, 100 mm x 2 mm), com fases móveis e demais condições descritas na Tabela 9.

Tempo (min)	%A	%B
0	80	20
7,5	50	50
8,5	0	100
9,0	80	20
15	STOP	

Figura 19: Cromatograma das tilosinas A e B.



A Figura 19 acima ilustra um cromatograma obtido pela injeção de solução proveniente do teste de degradação na condição 80°C por 7h em acetonitrila:água 1:1 (v/v) com 0,1% de FOA. Como pode ser observado, não foi possível separar cromatograficamente a tilosina C devido, provavelmente, a sua baixa concentração na solução.

Este método não foi eleito para a validação, pois somente permitiu a separação cromatográfica das tilosinas A e B. Estas também foram separadas cromatograficamente pelo outro método desenvolvido, onde mais outros sete macrolídeos estão incluídos. Portanto, preferiu-se validar uma metodologia que permitisse a separação cromatográfica do maior número de macrolídeos possíveis sem prejuízo dos produtos de degradação da tilosina.

4.3.2 Método cromatográfico e espectrométrico para as tilosinas A, B e C e os outros macrolídeos incluídos no estudo da seletividade do método validado

Baseando-se no método desenvolvido no laboratório para a separação das tilosinas A, B e C descrito na seção anterior, e também no método desenvolvido por Pereira (em 2012) para a separação de ionóforos poliéteres em leite foi desenvolvido um outro método cromatográfico capaz de separar todos os macrolídeos em estudo. As fases móveis, fluxo e temperatura do forno de coluna foram as mesmas daquelas desenvolvidas para a separação das tilosinas A, B e C variando-se o programa de eluição gradiente (Tabela 11), atingindo-se um tempo total de corrida de 20 minutos. A coluna Kinetex novamente não apresentou boa repetibilidade e assim, a coluna Polaris C-18A foi empregada. Embora gradientes ternários como o descrito por Pereira (2012) tenham sido testados, não foram satisfatoriamente superiores ao gradiente binário adotado. Ácido fórmico 0,1% como modificador orgânico forneceu maiores intensidades de sinal.

Tabela 11: Programa de eluição gradiente.

Tempo (min)	%A	%B
1,00	75	25
9,50	50	50
9,60	5	95
10,0	5	95
10,1	75	25
20,0	STOP	

As demais condições do cromatógrafo e do espectrômetro foram:

a) programação do injetor automático:

- volume de rinsagem: 500 μ L;
- profundidade da agulha: 52 mm;
- velocidade de rinsagem: 35 μ L/segundo;

- velocidade de amostragem: 5,0 $\mu\text{L}/\text{segundo}$;
 - tempo de purga: 25 min;
 - tempo de imersão na rinsagem: 10 s;
 - modo de rinsagem: antes e após a aspiração;
 - habilitação do sistema de resfriamento: sim;
 - temperatura do sistema de resfriamento: 4°C;
 - controle da profundidade da agulha no *vial*: 45 mm;
 - método de bombeamento: rinsar bomba e pósito entre análise (“rinse pump and port between analysis”);
 - tempo de rinsagem: 4 s;
- b) interface: eletrospray;
- c) modo: MRM positivo;
- d) gás de cortina: N_2 valor 10;
- e) gás de nebulização (GS1): N_2 valor 55;
- f) gás de secagem (GS2): N_2 valor 55;
- g) voltagem do ionspray (IS): 5000V;
- h) voltagem do potencial de entrada (EP): 10V;
- i) voltagem do detector (CEM): 2500V
- j) voltagem do defletor (DF): -100
- k) temperatura da fonte TurbolonSpray: 550°C;
- l) gás de colisão (CAD gas): N_2 valor 6;
- m) dwell time: 50; MR pause = 5 ms;
- n) tempo de aquisição: 20 min;
- o) volume de injeção: 10 μL

Como não foi possível obter as condições espectrométricas para a tilosina D e a intensidade da tilosina C foi extremamente reduzida, não possibilitando a detecção da mesma em todas as soluções padrão de tilosina, incluindo as provenientes dos experimentos de degradação, somente as tilosinas A e B, além dos demais macrolídeos para os quais se avaliou a seletividade do método validado foram incluídos no método final. A Tabela 12 apresenta as condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de macrolídeos obtidas na etapa de otimização e nos experimentos de validação. Na otimização, para os analitos espiramicina,

roxitromicina e tilmicosina, tanto as espécies $[M+H]^+$ quanto $[M+2H]^{2+}$ foram observadas e para a troleandomicina além da molécula protonada $[M+H]^+$, um íon $[M+H-42]^+$ foi observado e identificado, por comparação com dados da literatura, como desacetiltroleandomicina. Por esse motivo, todas as espécies observadas foram incluídas.

Tabela 12: Resultados das condições analíticas do LC-MS/MS:

Analito	t_R	Íon precursor	Íon produto	Dwell (ms)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Tilosina A $[M+H]^+$	7,06	916,62	174,1	50	226	49	18
			772,4			39	24
			156,1			61	22
Tilosina B $[M+H]^+$	5,01	772,50	174,1	50	181	41	18
			156,0			51	18
			132,2			43	20
Espiramicina $[M+H]^+$	2,13	843,59	174,1	50	171	47	10
			142,1			45	16
			540,4			41	16
Espiramicina $[M+2H]^{2+}$	2,13	422,37	174,0	50	126	29	30
			144,9			19	22
			540,2			15	10
Troleandomicina $[M+H]^+$	10,11	814,38	200,1	50	226	35	12
			158,1			59	20
			116,1			77	16
Troleandomicina $[M\text{-acetil}+H]^+$	8,83	772,48	158,1	50	146	37	16
			586,2			25	20
			116,0			57	20
Oleandomicina $[M+H]^+$	4,46	688,39	158,2	50	136	35	20
			544,4			21	18
			116,3			55	14
Roxitromicina $[M+H]^+$	8,62	837,46	158,2	50	171	47	16
			679,5			29	22
			116,2			57	16
Roxitromicina $[M+2H]^{2+}$	8,62	419,41	158,0	50	86	21	22
			116,0			33	20
			573,5			13	18
Eritromicina $[M+H]^+$	5,8	734,56	158,2	50	171	41	14
			576,2			23	18
			116,0			51	14
Tilmicosina $[M+H]^+$	3,62	869,58	174,3	50	356	57	12
			696,4			53	24
			126,1			77	18

Analito	t _R	Íon precursor	Íon produto	Dwell (ms)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Tilmicosina [M+2H] ²⁺	3,62	435,34	174,0	50	106	33	22
			695,6			19	22
			126,1			49	26
Claritromicina [M+H] ⁺	8,3	748,52	158,2	50	146	35	16
			590,2			25	20
			116,1		146	49	16

4.3.3 Método cromatográfico e espectrométrico desenvolvido no LC-Triplo TOF/MS

Buscando-se identificar possíveis produtos de degradação da tilosina, um equipamento mais sensível que o LC-MS/MS foi utilizado, onde outro método cromatográfico e espectrométrico foi desenvolvido através da infusão de solução padrão de tilosina. As condições utilizadas no cromatógrafo e no espectrômetro de massas Triplo-TOF 5600 estão dispostas nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13: Condições cromatográficas do LC-Triplo TOF/MS

Fases móveis	Fluxo da fase móvel	Temperatura do forno	Tempo total de corrida
A: 0,1% FOA em água + 5mM de formiato de amônio	250 µL/minuto	40 °C	15 min
B: 0,1% FOA em MeOH + 5mM de formiato de amônio			

Tabela 14: Programa de eluição gradiente do LC-Triplo TOF/MS

Tempo (min)	%A	%B
0	95	5
0,5	95	5
5	5	95
10	5	95
11	95	5
15	95	5

Tabela 15: Condições espectrométricas do LC-Triplo TOF/MS

Parâmetro	Valor
CUR	25
GS1	45
GS2	45
IS	5500
TEM	450

4.4 Procedimentos de extração/purificação testados

Os procedimentos de extração para a determinação de resíduos de macrolídeos em leite basearam-se nos experimentos realizados por Pereira (2012), onde um método direto foi comparado com um método QuEChERS desenvolvido pelo autor (nesse caso utilizou-se os sais $MgSO_4$ e $NaOAc$) e em outro desenvolvido pela empresa Agilent (Califórnia, Estados Unidos) (método QuEChERS), no qual um método de triagem de 36 drogas veterinárias (incluindo macrolídeos) em leite, dentre outros produtos de origem animal, por LC-MS/MS, foi proposto como adaptação do método QuEChERS original (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

A Tabela 16 apresenta os resultados dos métodos 1 e 2 desenvolvidos pela Agilent® para a extração de macrolídeos utilizando-se diferentes composições de sais. O método 2, que consiste na extração com os sais Na_2SO_4 (sulfato de sódio) e $NaCl$ (cloreto de sódio) com posterior clean-up por SPE-dispersivo com C18EC e Na_2SO_4 , demonstrou maiores recuperações quando comparados ao uso de $MgSO_4$ (sulfato de magnésio) utilizado no método QuEChERS original. Considerando-se que a etapa de SPE-dispersivo nos métodos 1 e 2 é a mesma, pode-se concluir que o Na_2SO_4 é superior ao $MgSO_4$ para a extração dos macrolídeos. Entretanto, com o objetivo de ultrapassar a recuperação de 70% obtida com o método da Agilent, procurou-se outras alternativas.

Tabela 16: Resultados do teste realizado pela Agilent para a extração de macrolídeos utilizando-se diferentes composições de sais.

Método	1	2
Sais extratores	MgSO ₄ + NaCl	Na ₂ SO ₄ + NaCl
SPE dispersivo	C18EC+ Na ₂ SO ₄	C18EC+ Na ₂ SO ₄
Solvente extrator	1% de ácido fórmico em acetonitrila	1% de ácido fórmico em acetonitrila
Água	4mL	4mL
Recuperação de macrolídeos	45,12%	70,46%

O método de extração QuEChERS inovador para os antibióticos macrolídeos em leite proposto nesta dissertação utiliza os mesmos sais secantes Na₂SO₄ e o NaCl para promover o efeito *salting out*, entretanto a adição de um terceiro sal, o carbonato de potássio (K₂CO₃), tem como objetivo elevar o pH de extração (pH = 9,5), para promover um aumento na recuperação do método, já que os macrolídeos apresentam pKa entre 6,63 e 9,50. Considerando que na faixa de pH entre 8,63 a 11,50 os analitos estarão 99% na forma não ionizada (mais solúvel em solventes orgânicos) e 1% na forma ionizada, 99% das espécies dos analitos de interesse migram para o solvente de extração (ACN), enquanto a maior parte dos interferentes provenientes da matriz permanecem na fase aquosa, promovendo uma maior recuperação dos antibióticos e uma maior limpeza da amostra (Tabela 17).

Tabela 17: Valores de pKa dos macrolídeos.

Analito	pKa 1	pKa 2	pH ideal para extração	pH ideal para dessorção
Eritromicina	8,88	-	10,88	6,88
Tilosina	7,1	-	9,10	5,10
	7,7	-	9,70	5,70

Analito	pKa 1	pKa 2	pH ideal para extração	pH ideal para dessorção
Tilmicosina	7,40	8,5	9,40 – 10,50	5,40 – 6,50
	8,18	ND	10,18	6,10
Troleandomicina	6,63	-	8,63	4,63
Oleandomicina	8,84	-	10,84	6,84
Roxitromina	9,20	ND	11,20	7,20
Espiramicina	7,90	ND	9,90	5,90
Claritromicina	8,99	-	10,99	6,99

ND: não disponível.

Fontes: The Merck Index, 2013; SANLI e col., 2010; MOFFAT e col., 2011.

A Tabela 18 apresenta os resultados dos testes de extração efetuados através da fortificação de um leite isento de macrolídeos no nível correspondente a 50 ng/mL (1LMR) para as substâncias que possuem LMR estabelecido e 20 ng/mL (2LOQ) para aquelas que não o possuem. Todas as amostras foram injetadas em triplicata.

Os resultados expostos correspondem às formas mais intensas de cada analito, onde foram monitoradas as forma $[M+2H]^{2+}$ para a espiramicina e roxitromicina e a forma $[M\text{-acetil}+H]^+$ para a troleandomicina. Para os demais analitos, como possuem somente um átomo de nitrogênio em suas moléculas, geram apenas as formas $[M+H]^+$, que foram também monitoradas.

Tabela 18: Resultados dos testes direto, QuEChERS inovador e QuEChERS inovador com SPE-dispersivo para a extração de macrolídeos em leite.

ANALITO	TESTE															
	Direto		1		2		3		4		5		6		7	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
TIL A	92	2,13	92	4,96	30	3,52	37	2,80	92	29,80	50	24,70	91	2,20	30	76,75
ESPI	188,9	28,4	104	9,60	30	0,06	39	4,19	156	56,17	62	25,94	102	0,77	84	9,82
TROL	85,7	38,8	74	2,75	88	5,14	79	18,84	69	47,18	127	39,77	108	5,98	70	13,14
OLE	109	8,6	94	2,86	92	0,00	88	1,67	45	69,94	82	1,86	85	0,88	80	8,14
ROX	131,2	10,8	90	6,56	89	17,22	99	13,22	104	11,89	90	10,20	92	7,64	62	5,66
ERI	100,7	4,9	98	1,00	44	79,19	71	10,04	391	124,17	80	5,70	83	57,68	75	2,78
CLA	103,1	39,5	80	8,3	90	5,30	88	0,11	101	2,64	105	18,10	94	1,08	75	5,73

1: teste QuEChERS inovador;

2: teste QuEChERS inovador com clean-up por SPE dispersivo com 150mg de MgSO₄, 50mg de PSA e 50mg de C18;

3: teste QuEChERS inovador com clean-up por SPE dispersivo com 150mg de MgSO₄, 50mg de PSA;

4: teste QuEChERS inovador com clean-up por SPE dispersivo com 150mg de MgSO₄ e 50mg de C18;

5: teste QuEChERS inovador com clean-up por SPE dispersivo com 150mg de Na₂SO₄, 50mg de PSA e 50mg de C18;

6: teste QuEChERS inovador com clean-up por SPE dispersivo com 150mg de Na₂SO₄ e 50mg de PSA;

7: teste QuEChERS inovador com clean-up por SPE dispersivo com 150mg de Na₂SO₄ e 50mg de C18.

Em relação à tilosina, os resultados dos testes direto, 1 e 6 mostraram-se satisfatórios, onde as porcentagens de recuperação e RSD obtidos foram muito próximos. Para este analito, o teste 4 apresentou a mesma recuperação (92%) dos testes direto e teste 1, porém um RSD muito grande (29,8%).

Para a espiramicina, os melhores resultados foram obtidos nos testes 1 e 6, onde a maior recuperação se deu no teste 1 (104%) e o menor RSD foi observado no teste 6 (0,77%).

No caso da troleandomicina, os testes 1, 2 e 6 mostraram-se satisfatórios. Nesse caso, embora os testes 2 e 6 tenham resultado em melhores recuperações (88% e 108%), o menor RSD foi observado para o teste 1 (2,75%), onde uma boa recuperação também foi obtida (74%).

Para a oleandomicina, os testes 1 e 2 apresentaram ótimas recuperações e desvios baixos, embora os testes direto, 3, 5 e 6 também se mostrarem satisfatórios, mas as recuperações foram mais baixas que nos outros.

A roxitromicina demonstrou melhores resultados nos testes 1 e 6, onde as recuperações e desvios obtidos foram muito semelhantes (90% com RSD de 6,6% e 92% com RSD de 7,6%, respectivamente). Embora um baixo RSD (5,6%) tenha sido observado no teste 7, a recuperação obtida foi mais baixa que nos outros testes (62%). Os demais testes apresentaram desvios muito grandes, o que inviabiliza seu uso.

Os testes direto e teste 1 mostraram-se aplicáveis para a extração da eritromicina, enquanto os testes 2, 4 e 6 apresentaram desvios extremamente elevados, 79%, 124% e 77%, respectivamente, inviabilizando a adoção destes métodos de extração/purificação.

A extração da claritromicina apresentou bons resultados em quase todos os testes; somente os testes direto e 5 apresentaram desvios grandes, o que os exclui da possibilidade de uso para esta finalidade.

Portanto, a partir dessas observações, concluiu-se que os testes 1 e 6 apresentaram os melhores resultados para o total de macrolídeos estudados. Porém, como o método do teste 6 não se aplica à extração da eritromicina (já que o RSD observado foi muito grande), o método do teste de extração 1 foi o escolhido, pois não há necessidade de uma etapa posterior para o clean-up da amostra, tornando-o mais rápido e mais barato. Assim, como para a tilosina, a etapa de purificação por SPE dispersivo aplicada aos extratos obtidos nos métodos de

extração não demonstrou ganhos em relação aos métodos contendo somente a etapa de extração, o método final contendo somente a extração QuEChERS com os sais Na₂SO₄, NaCl e K₂CO₃ foi o escolhido para a validação.

Antes de iniciar a validação, foi verificada a resposta da tilosina em oito níveis de concentração a fim de confirmar o resultado obtido acima com uma única concentração e estudar a resposta analítica nas concentrações de 6,25ng/mL a 150ng/mL, incluindo agora o efeito matriz. O efeito matriz foi avaliado comparando-se a média da área obtida de uma amostra fortificada no final do procedimento com a de uma amostra preparada no diluente no mesmo nível de concentração, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Efeito matriz} = \frac{\text{média da área da amostra fortificada no final} \times 100}{\text{média da área do analito no diluente}}$$

Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 19 abaixo:

Tabela 19: Verificação da resposta da tilosina pelo método escolhido para validação.

TILOSINA A				
	Concentração (ng/mL)	Recuperação Média (%)	RSD (%)	Efeito Matriz (%)
P0	0	0	0	0
P1	6,25	85,86	5,62	-5,86
P2	12,5	78,64	3,38	+3,63
P3	25	78,37	7,88	+1,92
P4	50	87,83	5,34	-2,26
P5	75	77,30	1,23	-4,14
P6	100	86,91	5,53	-0,38
P7	125	77,25	6,04	+1,30
P8	150	82,63	1,60	+0,44

Como pode ser observado, a recuperação da tilosina variou de 87,83% a 77,25%, com RSD máximo de 7,88%, e um efeito matriz não significativo foi obtido,

demonstrando que o método se comportou adequadamente indicando que a validação poderia ser iniciada.

4.5 Validação

4.5.1 Seletividade (incluindo o efeito matriz relativo)

Das 41 amostras adquiridas (Tabela 4, seção 3.2.5) somente 15 se apresentaram comprovadamente isentas dos macrolídeos pesquisados, através do cálculo da razão sinal/ruído para a segunda transição. Todos os sinais nas janelas de tempo de retenção nas quais os analitos eram esperados nas três transições de MRM foram integrados e avaliados, e somente picos com razão sinal/ruído ≥ 3 , ou seja, acima do limite de detecção do método, foram considerados detectados. A substância espiramicina foi detectada em 21 amostras e a tilosina em 5 amostras. A Figura 20 apresenta um cromatograma típico de uma amostra de leite contendo espiramicina, a Figura 21 de uma amostra de leite contendo tilosina e a Figura 22 de uma amostra branca para todos os analitos pesquisados. 15 leites apresentaram-se como comprovadamente isentos de tilosina e dos demais analitos pesquisados para a seletividade:

- 4 leites UAT (050/2013; 052/2013; 058/2013; 067/2013),
- 4 leites pasteurizados (040/2013; 041/2013; 064/2013; 065/2013),
- 2 leites em pó (044/2013; ABR-2013/007) e
- 5 leites crus (ABR-2012/007; ABR-2012/008; ABR-2012/010; ABR-2012/012; ABR-2013/008).

Figura 20: Cromatograma de amostra de leite contendo espiramicina

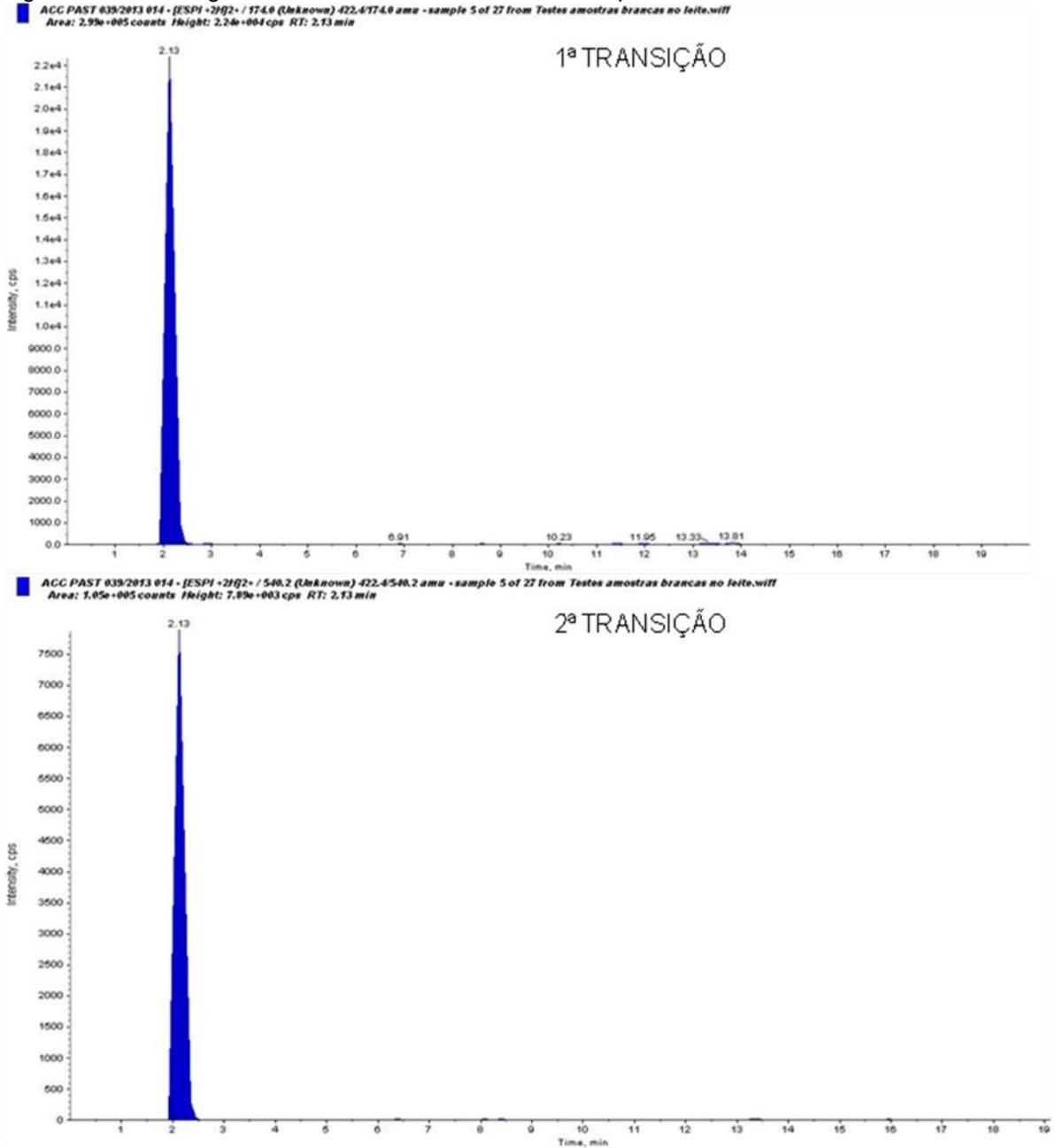


Figura 21: Cromatograma de amostra contendo tilosina

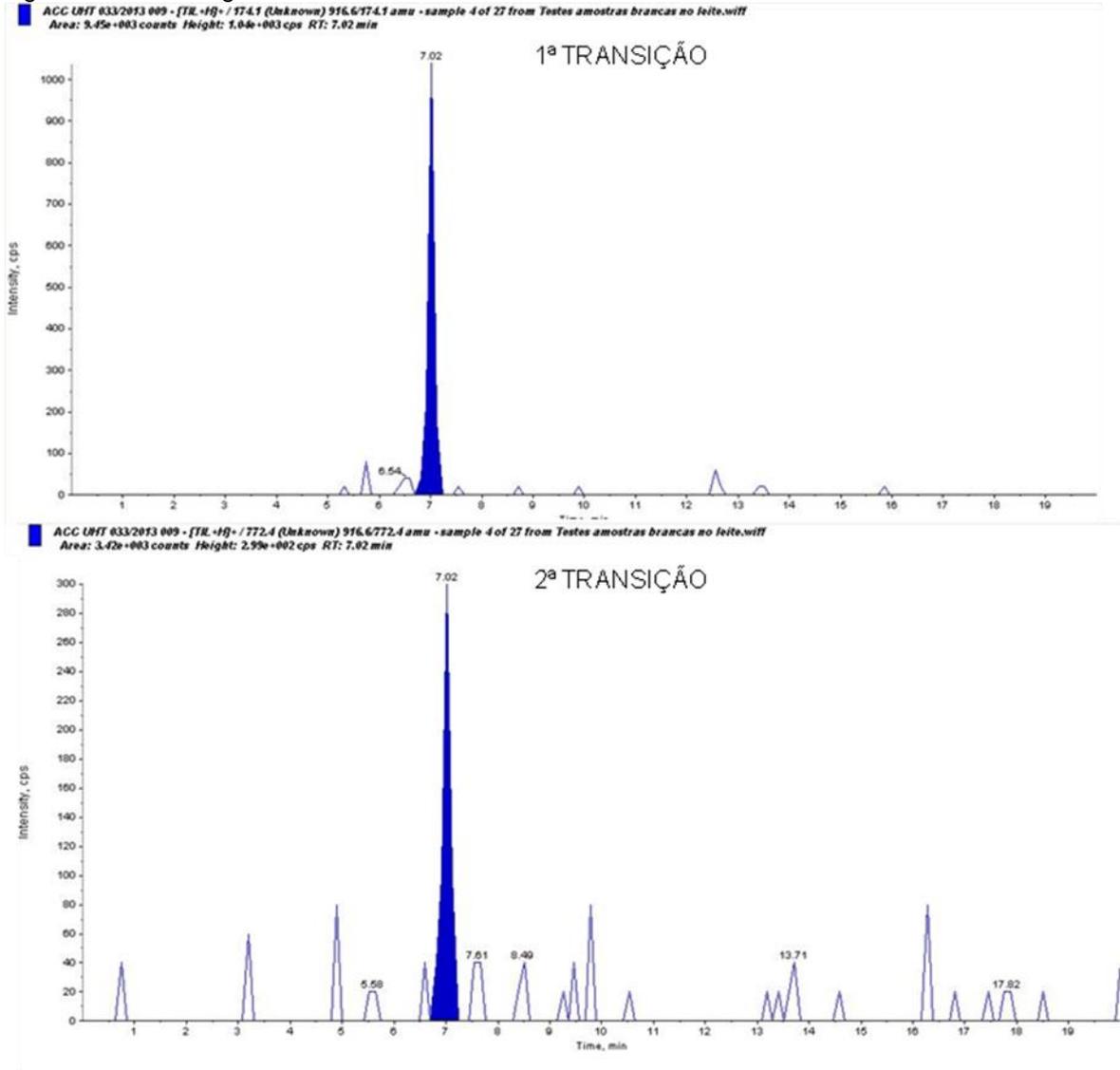
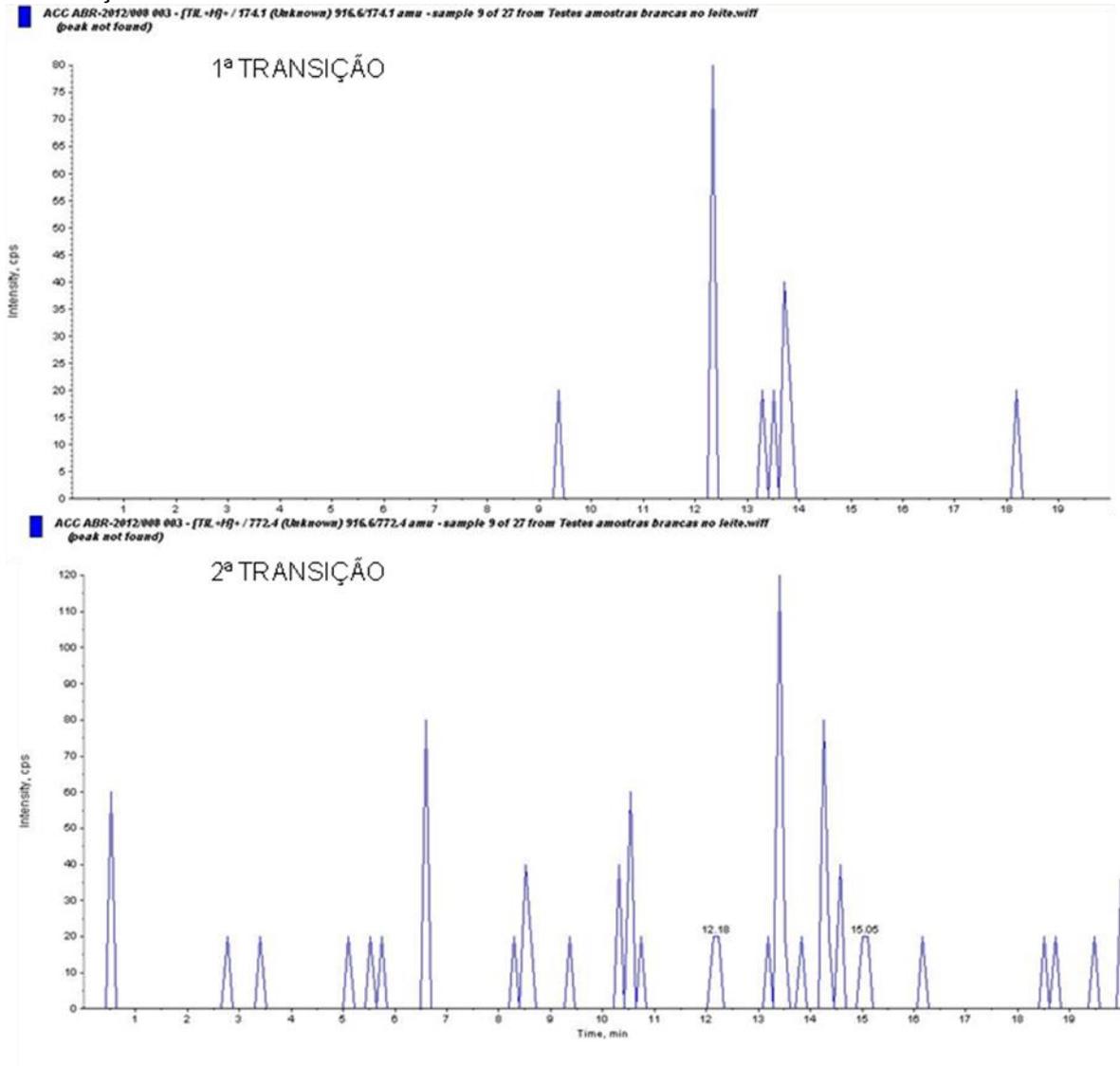


Figura 22: Cromatograma de amostra branca, apresentando as transições de quantificação e confirmação da tilosina.



Das 15 amostras de leites foram selecionadas 8 (2 de cada tipo de leite) para a realização do teste de seletividade para avaliação do efeito matriz relativo (Tabela 20).

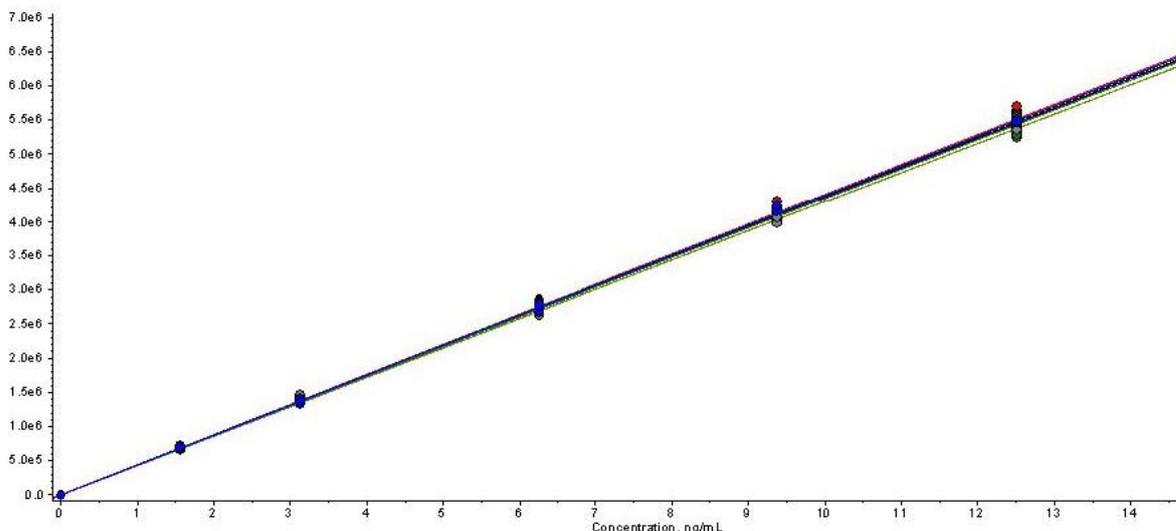
Tabela 20: Amostras selecionadas para avaliação do efeito matriz relativo.

Código	Fontes de matriz
040/2013	Leite pasteurizado
041/2013	Leite pasteurizado
050/2013	Leite UAT
052/2013	Leite UAT
ABR-2012/007	Leite cru
ABR-2013/008	Leite cru
044/2013	Leite em pó
ABR-2013/007	Leite em pó

Devido à alta seletividade da aquisição no modo MRM da técnica de espectrometria de massas sequencial, interferentes podem com frequência estar presentes, mas não serem detectados, portanto, a fim de avaliar se interferentes não detectáveis podem influenciar na resposta do detector, e conseqüentemente na quantificação dos analitos alvo, oito amostras brancas já extraídas foram fortificadas no final do procedimento conforme descrito na seção 3.2.7.6 (Figura 4).

Todos os sinais nas janelas de tempo de retenção nas quais os analitos são esperados nas três transições de MRM foram integrados e avaliados, e somente picos com razão sinal/ruído ≥ 3 , ou seja, acima do limite de detecção do método, foram considerados detectados. Nenhuma das oito amostras analisadas apresentou relação sinal/ruído ≥ 3 nas transições de quantificação e de confirmação. A Figura 23 apresenta as curvas de calibração construídas nas concentrações de 0,25 a 2,5 vezes o LMR de 50 ng/mL de tilosina nas oito diferentes amostras selecionadas. Como pode ser observado, as curvas se sobrepõem, apresentando um RSD do coeficiente angular de 3,2 %, demonstrando que não foi identificado um efeito matriz relativo, indicando que o método responde da mesma forma para leite UAT, leite em pó, leite cru e leite pasteurizado.

Figura 23: Curvas de calibração da avaliação do efeito matriz relativo do método para a tilosina, utilizando-se o método dos mínimos quadrados ponderados, com peso de $1/y$.



4.5.2 Intervalo de medição e intervalo linear

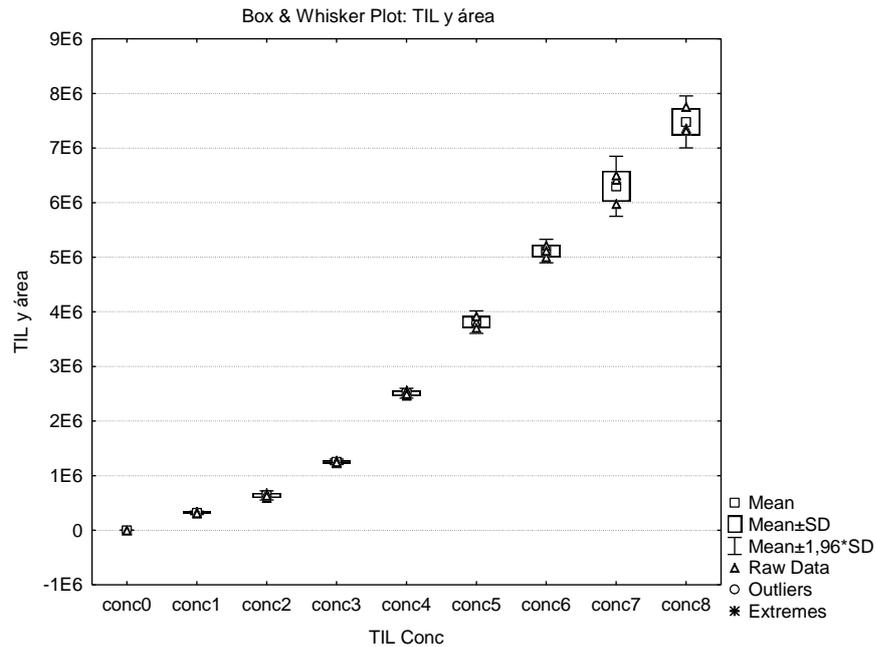
Para o estabelecimento do intervalo de medição e linear do instrumento, a razão sinal/ruído referente à menor concentração (0,125 vezes o LMR) foi calculada nas transições de quantificação (m/z 174.1) e de confirmação (m/z 772.4): 86 e 48,6, respectivamente, correspondente a uma concentração de 0,78ng/mL.

A partir dos dados experimentais não foram identificados valores aberrantes em cada nível de concentração de tilosina pelo teste de *Grubbs* considerando $\alpha=0,01$.

O teste de Levene indicou heterocedasticidade, ou seja, que as variâncias não foram constantes ao longo do intervalo de medição. Portanto, o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) por ser o mais indicado, foi o utilizado.

O diagrama de Box & Whisker dos dados agrupados para a tilosina (Figura 24) mostra a variação dos resultados com o aumento da concentração, o que foi confirmado pelo teste de Levene ($p=0,000528$).

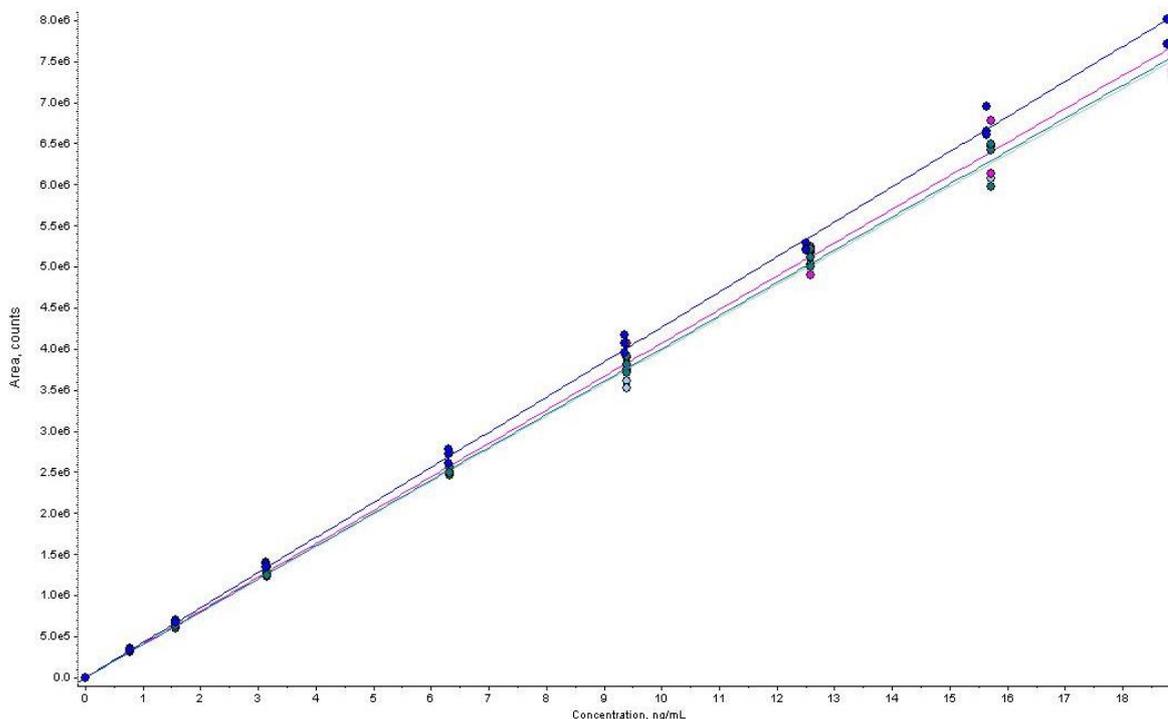
Figura 24: Diagrama de Box & Whisker dos dados agrupados da tilosina.



Considerando a heterocedasticidade dos dados, as curvas de calibração foram preparadas empregando-se o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) com peso igual a $1/y$ (onde y é a área).

A avaliação da linearidade do instrumento foi efetuada pela comparação do modelo linear com um modelo não-linear, descrita no POP 65.3120.136 do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, e demonstrou que o intervalo linear do instrumento coincide com o intervalo de medição avaliado, ou seja, de 0,78 a 18,75 ng/mL de tilosina.

Figura 25: Curvas de calibração no diluente preparadas em quatro dias diferentes para avaliação do intervalo de medição e linear.



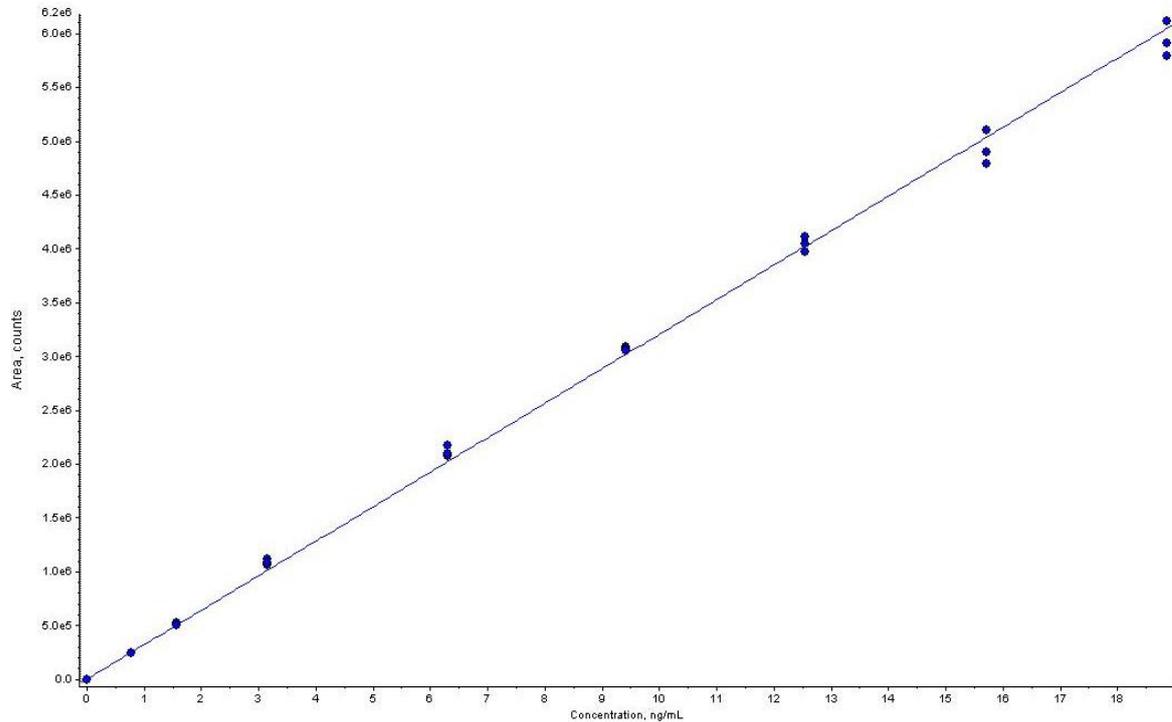
Como pode ser observado na Figura 25, não foram constatadas diferenças significativas nas curvas de calibração instrumentais, demonstrando a estabilidade da resposta do sistema LC-MS/MS ao longo dos quatro dias avaliados. Os coeficientes de correlação variaram de 0,994 a 0,997. Comparando os coeficientes angulares, o RSD observado foi de 3,2%.

4.5.3 Linearidade, sensibilidade e efeito matriz absoluto

Considerando que a avaliação da seletividade (seção 4.5.1) demonstrou não haver diferença significativa entre as matrizes estudadas, selecionou-se uma amostra de leite UAT (amostra 052/13) como representativa das demais. A curva de calibração com nove níveis de concentração, incluindo o zero, com fortificação no início do procedimento (Figura 26) demonstrou ser linear levando em consideração os mesmos critérios de avaliação da linearidade descritos na seção 4.5.2. Assim, o método demonstrou ser linear de 0,78 a 18,75 ng/mL de tilosina, equivalente a 0,125 a 3 vezes o LMR.

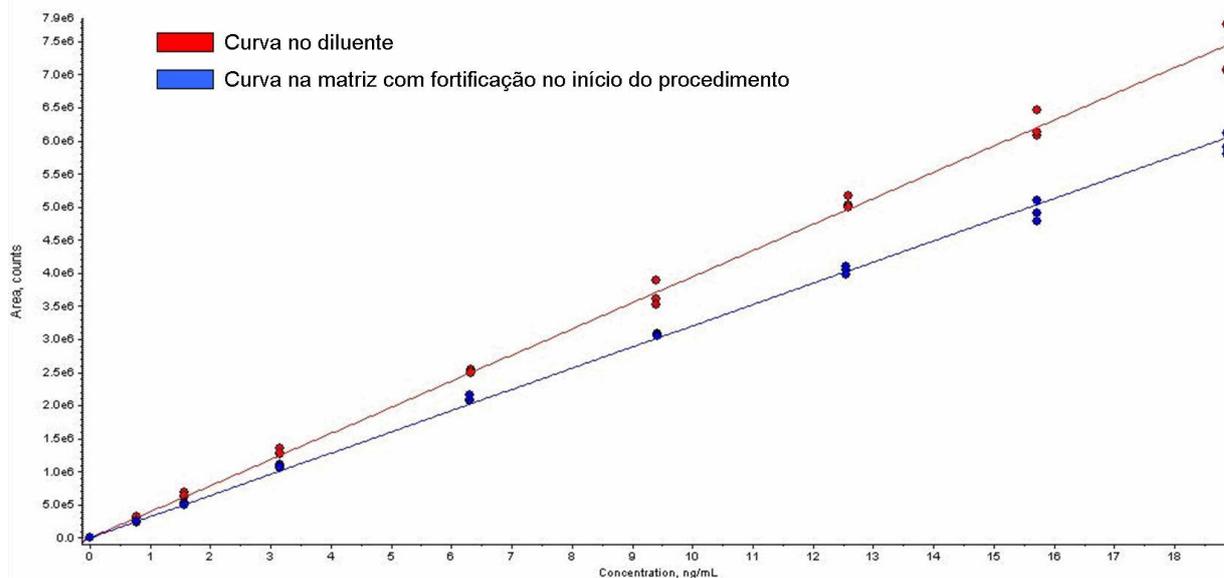
A sensibilidade, dada através do coeficiente angular das curvas de calibração descritas como $y=b_0 + b_1x$ obtidas com a matriz fortificada no início, foi de 3,57E+05.

Figura 26: Curva de calibração de tilosina na matriz com fortificação no início do procedimento.



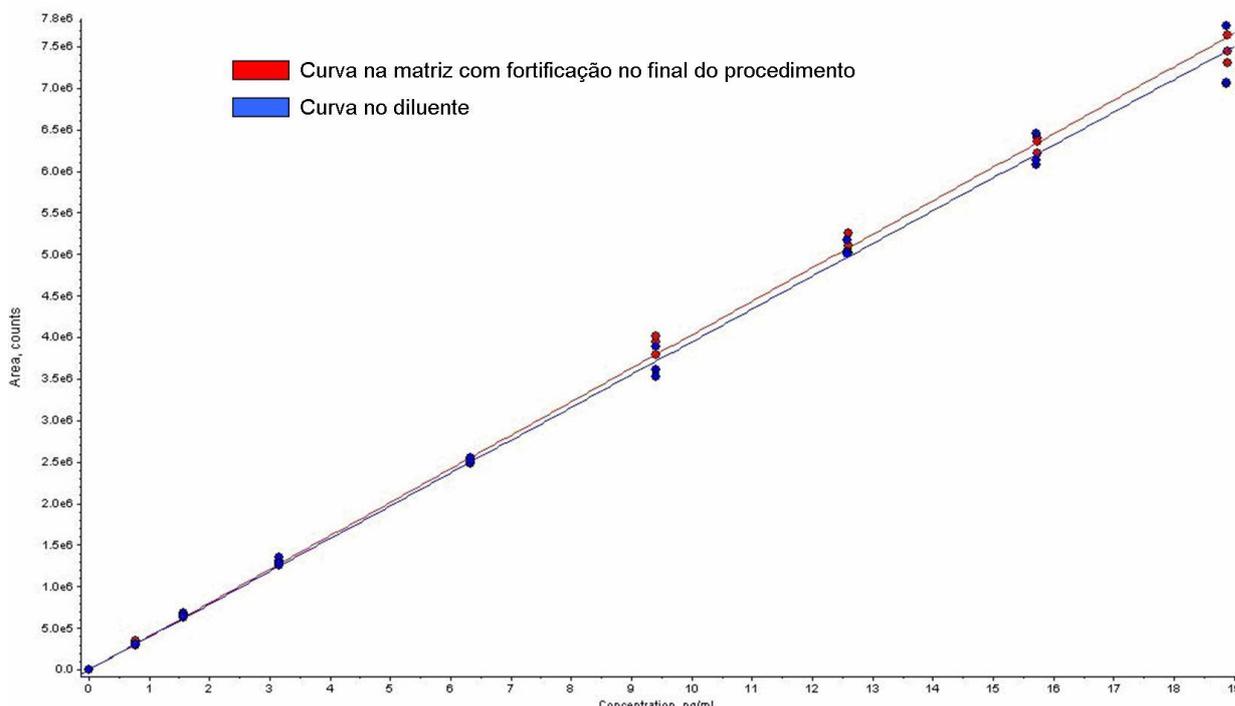
Comparando-se o coeficiente angular da curva de calibração com fortificação no início do procedimento com o da curva de calibração preparada no diluente (Figura 27) através do teste t-Student, confirmou-se que há diferença significativa entre ambas ($t_{cal2,06} > t_{tab2,02}$), devido a um erro sistemático proporcional proveniente de um efeito combinado de interferências da matriz e perdas de recuperação, indicando que não é possível quantificar amostras reais na curva de calibração construída no diluente. O uso da curva de calibração na matriz com fortificação no início do processo tem a vantagem de já incorporar uma correção de recuperação nos resultados analíticos obtidos e assim, não são necessárias correções de recuperação na análise das amostras.

Figura 27: Curvas de calibração de tilosina na matriz fortificada no início do procedimento e no diluente.



Comparando-se o coeficiente angular da curva de calibração fortificada no final do procedimento com o da curva de calibração preparada no diluente (Figura 28), através do teste t-Student, verificou-se que não há diferença significativa entre ambas ($t_{cal1,73} < t_{tab2,02}$), demonstrando que não foi observado efeito matriz absoluto de supressão ou aumento de sinal no processo de ionização no LC-MS/MS decorrente de substâncias outras, que não o analito de interesse.

Figura 28: Curvas de calibração de tilosina na matriz fortificada no final do procedimento e no diluente.



4.5.4 Repetibilidade, precisão intermediária, recuperação e eficiência da extração/purificação

Considerando que a análise das 18 amostras nos três dias analisados foram realizadas em condições de repetibilidade, os RSD_r globais não devem exceder os limites expostos na Tabela 21 (CAC, 2009). Estes limites equivalem a aproximadamente 2/3 dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (RSD_R) para cada nível de concentração.

Tabela 21: Desvios padrão relativos em condições de repetibilidade (RSD_r) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar.

Concentração	RSD_r
< 1µg/Kg	36%
≥ 1µg/Kg < 10µg/Kg	32%
≥ 10µg/Kg < 100µg/Kg	22%
≥ 100µg/Kg < 1000µg/Kg	18%
≥ 1000µg/Kg	14%

Fonte: CAC, 2009.

Os resultados de repetibilidade e recuperação do método em condições de repetibilidade para a determinação de tilosina em leite estão dispostos na Tabela 22:

Tabela 22: Repetibilidade e recuperação do método em condições de repetibilidade para a determinação de tilosina em amostras de leite fortificadas.

Tilosina adicionada	Estimativa	Tilosina encontrada ($\mu\text{g/Kg}$)			
		1º dia ^a	2º dia ^a	3º dia ^a	Global ^b
25 $\mu\text{g/Kg}$ (0,5LMR)	Média ^c	25,4	23,6	22,3	23,8
	SD	1,3	3,37	1,47	2,5
	RSD _r (%)	5,0	14,3	6,6	10,5
	Recuperação (%) ^d	101,2	93,8	88,8	94,6
50 $\mu\text{g/Kg}$ (1LMR)	Média ^c	51	50,1	46,2	49
	SD	1,9	3,4	2,6	3,4
	RSD _r (%)	3,7	6,8	5,7	6,9
	Recuperação (%) ^d	101,1	99,2	91,4	97
75 $\mu\text{g/Kg}$ (1,5LMR)	Média ^c	74,5	73	69,1	72,6
	SD	0,8	3,7	5,9	5,0
	RSD _r (%)	1,0	5,1	8,5	6,9
	Recuperação (%) ^d	98,2	96,2	91,1	95,7

^aseis replicatas verdadeiras em cada nível.

^bdezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^cconcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz com fortificação no início do procedimento.

^drecuperação para estimar o erro sistemático do método analítico

Segundo os resultados obtidos, pode-se concluir que o método analítico demonstrou repetibilidade aceitável para todos os níveis de concentração estudados e recuperações acima de 94,6%.

Quanto à avaliação da precisão intermediária, os RSD intralaboratoriais globais não devem ser superiores ao desvio padrão relativo de reprodutibilidade (RSD_r) para cada nível de concentração (Tabela 23).

Tabela 23: Desvios padrão relativos em condições de reprodutibilidade (RSD_R) para métodos quantitativos referentes a um intervalo de concentrações da substância a analisar.

Concentração	RSD_R
< 1µg/Kg	54%
≥ 1µg/Kg < 10µg/Kg	46%
≥ 10µg/Kg < 100µg/Kg	34%
≥ 100µg/Kg < 1000µg/Kg	25%
≥ 1000µg/Kg	19%

Fonte: CAC, 2009.

Os resultados de precisão intermediária e recuperação do método em condições de precisão intermediária para a determinação de tilosina em leite estão dispostos na Tabela 24 abaixo:

Tabela 24: Precisão intermediária e recuperação do método em condições de precisão intermediária para a determinação de tilosina em amostras de leite fortificadas.

Tilosina adicionada	Estimativa	Tilosina encontrada (µg/Kg)			
		1º operador ^a	2º operador ^a	3º operador ^a	Global ^b
25 µg/Kg (0,5LMR)	Média ^c	22,23	24,7	24,7	23,9
	SD	1,47	1,7	1,6	1,9
	RSD_R (%)	6,6	6,7	6,5	7,8
	Recuperação (%) ^d	88,8	98,2	98,2	95,1
50 µg/Kg (1LMR)	Média ^c	46,2	42,7	46,3	45,1
	SD	2,6	5,0	4,0	4,1
	RSD_R (%)	5,7	11,7	8,7	9,2
	Recuperação (%) ^d	91,4	84,6	91,8	89,3
75 µg/Kg (1,5LMR)	Média ^c	69,1	74	70,1	71
	SD	5,9	13,3	4,2	8,5
	RSD_R (%)	8,5	18,0	6,0	12
	Recuperação (%) ^d	91,1	97,6	92,4	93,7

^aseis replicatas verdadeiras em cada nível.

^bdezoito replicatas verdadeiras em cada nível.

^cconcentrações médias calculadas pelas curvas de calibração na matriz com fortificação no início do procedimento.

^drecuperação para estimar o erro sistemático do método analítico

Segundo os resultados obtidos, pode-se concluir que o método analítico demonstrou precisão intermediária aceitável para todos os níveis de concentração estudados com recuperações acima de 89,3%.

Como não existe um material de referência certificado (MRC) de tilosina em leite, não é possível avaliar a veracidade do método. Quando um MRC não está disponível, ao invés da tendência, calcula-se a recuperação, que será usada na investigação de erros sistemáticos (expressa como tendência ou recuperação).

A veracidade mínima, portanto, deve atender aos critérios estabelecidos pelo Brasil e União Europeia (Tabela 25) ou *Codex Alimentarius* (Tabela 26).

Tabela 25: Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos.

Concentração	Intervalo
$\geq 1 \mu\text{g/Kg}$	-50% a +2%
$> 1 \mu\text{g/Kg} < 10 \mu\text{g/Kg}$	-30% a +10%
$\geq 10 \mu\text{g/Kg}$	-20% a +10%

Fonte: União Europeia, 2002.

Tabela 26: Veracidade mínima (expressa como tendência ou recuperação) dos métodos quantitativos.

Concentração	Intervalo
$< 1 \mu\text{g/Kg}$	-50% a +20%
$\geq 1 \mu\text{g/Kg} < 10 \mu\text{g/Kg}$	-40% a +20%
$\geq 10 \mu\text{g/Kg} < 100 \mu\text{g/Kg}$	-30% a +20%
$\geq 100 \mu\text{g/Kg} < 1000 \mu\text{g/Kg}$	-30% a +10%
$\geq 1000 \mu\text{g/Kg}$	-30% a +10%

Fonte: CAC, 2009.

Como pode ser visto, a tilosina apresentou recuperações aceitáveis nas três concentrações estudadas considerando-se as especificações da União Europeia e *Codex Alimentarius*.

A eficiência de extração/purificação, avaliada nos experimentos de repetibilidade, variou de 79 a 82% e o RSD de 10,4 a 17%.

4.5.5 Limite de detecção (LOD)

Para a tilosina, os picos apresentaram razão sinal/ruído ≥ 3 nas transições de confirmação e de quantificação, atendendo aos critérios de identificação/confirmação preconizados (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

O valor do LOD calculado considerando a relação sinal/ruído ≥ 3 dos sinais instrumentais nas transições de confirmação, obtidos para 18 amostras analisadas sob condições de precisão intermediária no menor nível de fortificação estudado (0,5LMR) foi de 0,84 $\mu\text{g/Kg}$.

4.5.6 Limite de quantificação (LOQ)

O valor do limite de detecção corresponde à menor concentração em massa determinada com exatidão e precisão aceitáveis (IUPAC, 2013) Neste caso, o LOQ para a tilosina equivale a 2,79 $\mu\text{g/Kg}$.

4.5.7 Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ obtidos para a tilosina no método validado, considerando as curvas globais com 18 amostras fortificadas obtidas pelo método dos mínimos quadrados ponderados foram: 58,35 ng/mL e 71,70 ng/mL , respectivamente.

4.5.6 Estabilidade do analito

Foi avaliada a estabilidade da tilosina em soluções estoques através da diferença percentual relativa (DPR) das respostas (média das áreas dividida pela concentração) entre soluções recém-preparadas e soluções antigas, onde todos os resultados devem ser inferiores a 15%.

Foram comparadas soluções preparadas no ano de 2010 e dois preparos no ano de 2013 (2013A e 2013B). Os resultados estão dispostos na Tabela 27:

Tabela 27: Avaliação da estabilidade da solução estoque de tilosina.

Analito	Média das áreas da solução estoque		Concentração média das soluções estoque (ng/mL)		FR1	FR2	DPR
	2010	2013A	2010	2013A			
Tilosina / 174.1	2,60E+06	2,80E+06	964,130	1.001,862	2,70E+00	2,80E+00	-3.44

Analito	Média das áreas da solução estoque		Concentração média das soluções estoque (ng/mL)		FR1	FR2	DPR
	2013A	2013B	2013A	2013B			
Tilosina / 174.1	2,80E+06	2,77E+06	1.001,862	1.037,950	2,80E+00	2,67E+00	4.49

Analito	Média das áreas da solução estoque		Concentração média das soluções estoque (ng/mL)		FR1	FR2	DPR
	2010	2013B	2010	2013B			
Tilosina / 174.1	2,60E+06	2,77E+06	964,130	1.037,950	2,70E+00	2,67E+00	1.06

Como pode ser observado, todos os valores de DPR foram inferiores a 15%, portanto, pode-se concluir que a tilosina pode ser armazenada em temperatura inferior a -70°C por 3 anos.

4.6 Aplicação do método validado para a avaliação da estabilidade da tilosina em solução e em leites termicamente processados

4.6.1 Avaliação da estabilidade da tilosina em solução

Primeiramente pensou-se em submeter a solução de tilosina às mesmas condições de tempo e temperatura às quais os leites foram submetidos para verificar se haveria algum tipo de degradação, sem o efeito de proteção por constituintes do leite. No entanto, a simulação do tratamento térmico de UAT não foi possível, pois

não há possibilidade da solução padrão de tilosina em água alcançar a temperatura necessária (120°C) em condições de pressão atmosférica. Somente em alta pressão seria possível atingir esse valor, o que poderia ser alcançado com o uso de uma autoclave, porém o tempo necessário para a simulação (5 segundos) não seria possível nesse equipamento. Portanto, não foram obtidos resultados da simulação do tratamento a UAT da solução padrão de tilosina em água e somente resultados da pasteurização lenta e da pasteurização rápida serão discutidos.

Para avaliar os resultados utilizou-se como referência a solução não tratada termicamente, com a qual as concentrações obtidas após os processamentos térmicos foram comparadas. O teste de *Grubbs* demonstrou não haver valores aberrantes entre os resultados obtidos. A Tabela 28 abaixo apresenta os dados experimentais.

Tabela 28: Resultados obtidos no teste de avaliação da estabilidade da tilosina em solução.

Amostra	Concentração média de tilosina (ng/mL)*
Solução não tratada termicamente	11,5 (2,61)
Solução submetida à pasteurização lenta	11,2 (2,36)
Solução submetida à pasteurização rápida	13,3 (2,30)

*média (RSD), n=3.

Após o tratamento estatístico dos dados experimentais concluiu-se que houve diferença significativa entre a concentração média de tilosina na solução não tratada termicamente e na solução submetida à pasteurização lenta ($p=0,26$), sugerindo que houve degradação de 2,6% da molécula de tilosina quando submetida às condições de pasteurização lenta. Em relação aos dados obtidos na pasteurização rápida da solução de tilosina verificou-se um aumento da concentração de tilosina quando comparada à solução controle. Esse aumento pode ter ocorrido devido à evaporação de parte da água da solução através da abertura para a inserção do termômetro, portanto, os resultados deste ensaio não foram considerados.

A injeção de uma nova diluição das amostras confirmou os resultados anteriormente obtidos.

4.6.2 Avaliação da estabilidade da tilosina em leites termicamente processados

Para a realização dos três tratamentos térmicos volumes diferentes de leite foram utilizados. Para o tratamento UAT e para a pasteurização rápida foi utilizado um trocador de calor de superfície raspada que requer um volume de aproximadamente três litros de leite para que se tenha uma recuperação de aproximadamente um litro. Enquanto isso, a pasteurização lenta foi realizada em banho-maria com água onde o leite ficou armazenado em seu próprio recipiente onde não há perdas de volume.

O nível de fortificação do leite foi selecionado levando-se em consideração a faixa em que o método se mostrou linear. A concentração de 100 ng/mL de tilosina está dentro da faixa linear do método, além disso, pensou-se em trabalhar com esta concentração mais alta, pois caso os produtos de degradação tivessem sido formados, estariam em baixa concentração e, assim, aumentaria-se a possibilidade de detectá-los.

Considerando que uma grande parte dos trabalhos científicos publicados apresenta limitações estatísticas no tratamento dos dados relativos ao efeito do tratamento térmico sobre resíduos de medicamentos veterinários em leite, neste trabalho optou-se por tratar todos os resultados estatisticamente, diferentemente dos demais encontrados na literatura, pois acredita-se que estes resultados sejam mais confiáveis que aqueles resultantes somente de repetidas medições.

Para a verificação de valores aberrantes, os nove resultados das amostras de cada leite (amostra sem tratamento térmico, submetida à pasteurização lenta, submetida à pasteurização rápida e ao tratamento UAT) foram submetidos ao teste de *Grubbs*, onde se constatou somente um resultado aberrante na amostra de leite submetida à pasteurização lenta ($G_{cal} 2,40 > G_{crit} 2,11$). Para os demais, não foram observados valores aberrantes, portanto, trabalhou-se com um total de nove observações para estas, e oito observações para a amostra de leite submetida à pasteurização lenta. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 29.

Tabela 29: Concentração média de tilosina encontrada.

Amostra	Concentração média de tilosina (RSD)
Leite não tratado termicamente	94,01 ng/mL (2,08)*
Leite submetido à pasteurização lenta	83,85 ng/mL (1,9)**
Leite submetido à pasteurização rápida	81,50 ng/mL (3,4)*
Leite submetido ao tratamento UAT	87,93 ng/mL (7,4)*

* n=9; **n=8.

Após a verificação e exclusão dos valores aberrantes, foi realizado um teste para verificar a condição de normalidade dos dados, ou seja, verificar se as amostras provêm de uma distribuição normal. Para esta finalidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk a um nível de significância de 0,05%, bicaudal, onde foi observado que a amostra controle ($p=0,10$), a amostra de leite submetido à pasteurização lenta ($p=0,37$), a amostra de leite submetida à pasteurização rápida ($p=0,61$) e aquela submetida ao tratamento UAT ($p=0,77$) pertencem a uma distribuição normal.

Sabendo-se que as amostras são provenientes de uma distribuição normal, foi possível aplicar o teste t *Student*. Nesse teste a amostra controle (leite sem tratamento térmico) foi comparada com cada amostra tratada termicamente, a fim de verificar se as médias das mesmas são ou não significativamente diferentes. Para esta finalidade, primeiramente foi aplicado o teste F Snedecor, a fim de se comparar as variâncias e então decidir que tipo de teste t *Student* usar para comparar as médias das amostras. Quando no teste F Snedecor as variâncias se mostraram estatisticamente diferentes entre si, aplicou-se o teste t *Student* entre as duas amostras (controle x tratado termicamente) assumindo-se variâncias diferentes, caso contrário, aplicou-se o teste t *Student* assumindo-se variâncias iguais.

Para comparar a média da amostra controle com a média da amostra submetida à pasteurização lenta (controle x pasteurização lenta) foi aplicado o teste t *Student* para duas amostras com variâncias diferentes, onde verificou-se que as médias destas amostras são significativamente diferentes ($p=0,00007$). Já na comparação da média da amostra controle com a média da amostra submetida à pasteurização rápida (controle x pasteurização rápida) e com a média da amostra submetida ao tratamento UAT (controle x UAT), aplicou-se o teste t *Student* para

duas amostras com variâncias equivalentes. Nesse teste, também foi observado que a média da amostra controle diferiu estatisticamente das amostras da pasteurização lenta e do tratamento UAT ($p=0,000002$ e $p=0,03$, respectivamente).

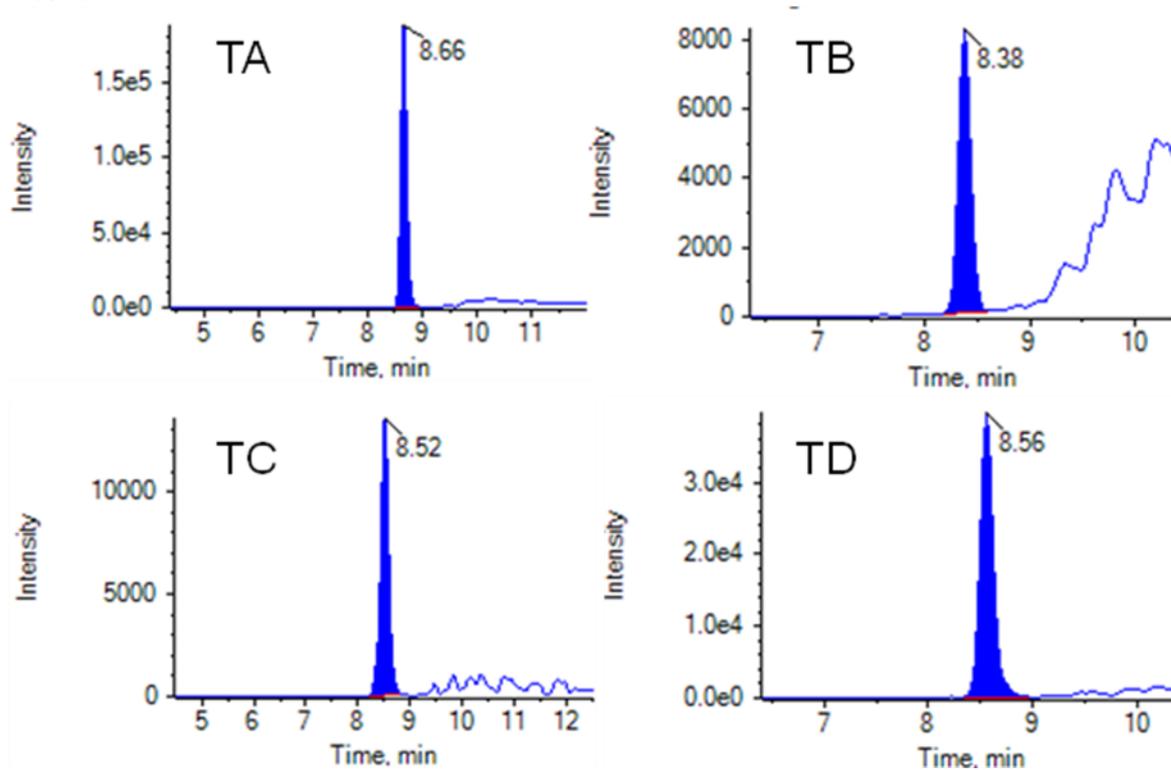
Na pasteurização lenta foi observada uma redução de 10,8% na concentração de tilosina A, 13,31% na pasteurização rápida, e 6,47% no tratamento UAT. Portanto, cerca de 89,2%, 86,7% e 93,5% de tilosina A permanece no leite após os processos de pasteurização lenta, pasteurização rápida e tratamento UAT, respectivamente.

4.7 Avaliação das soluções padrão e amostras analisadas por LC-Triplo TOF/MS

No equipamento LC-MS/MS API 5000 foi possível detectar os íons precursores da tilosina A, B e C no modo varredura no primeiro quadrupolo (Q1 scan), enquanto a tilosina D não havia sido detectada. No método desenvolvido neste estudo para a determinação de resíduos de macrolídeos em leite por LC-MS/MS, somente as tilosinas A e B puderam ser obtidas devido à sensibilidade do método.

Nas análises realizadas no equipamento Triplo-TOF™ 5600 foi possível observar que o padrão de tilosina continha além da tilosina A, as tilosinas B, C e D como impurezas não declaradas pelo fabricante (USP) (Figura 29).

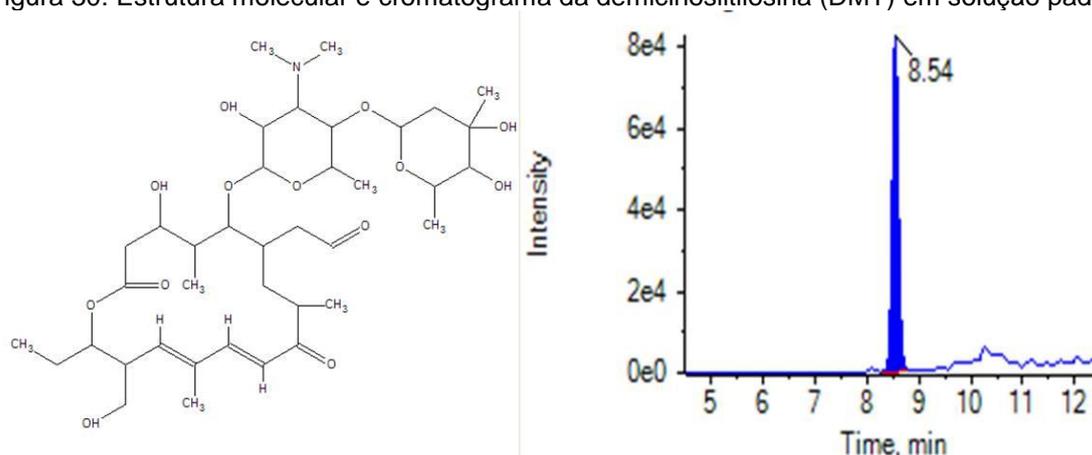
Figura 29: Cromatograma de aduto de tilosina A, B, C e D com metanol obtido no padrão de tilosina.



Fonte: AB Sciex.

Outra observação importante foi a identificação de um metabólito da tilosina, a demicinosiltosina (DMT) de m/z 742,4372, fórmula molecular $C_{38}H_{63}NO_{13}$ e massa molecular 741,4294g/mol no padrão de tilosina (Figura 30). Essa substância forma-se a partir da perda do açúcar micinose da molécula de tilosina A. Isso foi possível somente usando um equipamento de alta resolução que confere alta especificidade e sensibilidade.

Figura 30: Estrutura molecular e cromatograma da demicinosiltilosina (DMT) em solução padrão.



Fonte: AB Sciex.

No padrão de tilosina as tilosinas A, B, C, D e a DMT estavam presentes nas proporções de 69,3%, 1,6%, 3,6%, 8,5% e 16,9%, respectivamente. Na Tabela 30 estão expostos os resultados, em termos percentuais, dessas substâncias antes e após os tratamentos de pasteurização lenta e pasteurização rápida. Não foi possível obter os resultados do tratamento a UAT na solução padrão, pois não há possibilidade de levar a solução preparada em água à temperatura acima de 100°C, à pressão atmosférica, necessária para a simulação do tratamento UAT.

Tabela 30: Avaliação dos resultados obtidos no Triplo-TOF

	TA (%)	TB (%)	TC (%)	TD (%)	DMT (%)
Controle	69,3	1,6	3,6	8,5	16,9
Pasteurização rápida	67,4	6,3	3,2	7,7	15,4
Pasteurização lenta	68,9	3,8	3,1	7,6	16,6

Os resultados acima foram avaliados de forma a estimar, em termos percentuais, a redução ou aumento da concentração das tilosinas A, B, C, D e DMT após os tratamentos térmicos empregados conforme Tabela 31.

Tabela 31: Estimativa do aumento ou redução da concentração de tilosina após os processamentos térmicos

Processo térmico	Aumento (+) ou redução (-) observado				
	TA (%)	TB (%)	TC (%)	TD (%)	DMT (%)
Pasteurização rápida	- 1,9	+4,6	-0,4	-0,8	-1,6
Pasteurização lenta	- 0,4	+2,2	-0,5	-0,9	-0,3

Como pode ser observado na Tabela 31 acima, verificou-se que nos dois processos de pasteurização houve redução da concentração da tilosina A com aumento da concentração de tilosina B. Esse aumento ocorreu, provavelmente, devido à degradação da tilosina A com perda do açúcar micarose formando a tilosina B. Esse ganho foi mais expressivo na pasteurização rápida (+4,6%) que na pasteurização lenta (+2,2%), indicando que o tratamento do leite à temperatura de 72 a 75°C por 15 a 20 segundos é mais significativo para a degradação da tilosina A que o tratamento a 65°C por 30 minutos. Portanto, do ponto de vista da formação de produtos de degradação, a pasteurização rápida promove a formação de mais substâncias resultantes da degradação térmica da molécula de tilosina A que a pasteurização lenta, porém, do ponto de vista da persistência da tilosina na sua forma ativa no leite, a pasteurização lenta se mostrou ser um tratamento menos eficaz na degradação dessa molécula.

Embora não tenha sido possível obter a porcentagem de degradação da molécula de tilosina no leite após os tratamentos térmicos comerciais empregados neste estudo, já que a amostra controle não pôde ser analisada, através desta técnica foi possível ao menos observar que as tilosinas A, B, C e D estavam presentes em todas as amostras de leite fortificadas tratadas termicamente.

Em relação às amostras brancas de leite (amostras não fortificadas e tratadas termicamente) e as tratadas termicamente, com a finalidade de identificar os possíveis produtos de degradação no equipamento triplo-TOF, foi constatada que a DMT estava também presente em todas as amostras de leite, inclusive nas brancas nas quais não haviam sido identificadas as tilosinas A, B, C e D. Pode-se supor, portanto, que o animal do qual o leite foi retirado pode ter recebido um medicamento

ou razão que continha tilosina há muito tempo antes da retirada do leite e ainda estar eliminando este metabólito.

A razão da DMT na amostra tratada termicamente em relação à amostra branca foi calculada e os resultados estão dispostos na Tabela 32.

Tabela 32: Razão DMT amostra tratada termicamente/amostra branca.

Tratamento térmico empregado	Razão DMT amostra tratada termicamente/amostra branca
Pasteurização rápida	6,1
Pasteurização lenta	4,2
UAT	2,5

A razão de DMT encontrada nas amostras tratadas termicamente em relação àquela encontrada nas amostras brancas revelou que na pasteurização rápida ocorreu maior acréscimo da quantidade de DMT em relação aos outros tratamentos térmicos, revelando que nas condições de temperatura e tempo de aquecimento da pasteurização rápida há formação de maior quantidade desse metabólito que nos demais tratamentos, embora nos outros também tenha sido observado um aumento de DMT.

5 CONCLUSÃO

Nos dias atuais uma das maiores preocupações em relação à segurança alimentar não consiste somente na determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos, mas também dos possíveis produtos que possam ser gerados durante o seu tratamento térmico. A magnitude do impacto dos produtos de degradação de um antimicrobiano no alimento processado ainda não foi elucidada, porém, especula-se que esses produtos possam ser ainda mais tóxicos que suas moléculas originais. Além deste, outro fator de risco para o consumidor são os efeitos do uso de agentes antimicrobianos nas práticas veterinárias sobre a questão da resistência bacteriana aos antibióticos de uso humano. Nesse caso, é de grande importância o conhecimento da estabilidade térmica de antimicrobianos comumente usados na pecuária a fim de se obter dados sobre a exposição humana a estas substâncias já que, caso os tratamentos térmicos comercialmente empregados não sejam capazes de degradar o antimicrobiano presente, este ainda permanecerá no alimento destinado ao consumo humano.

Embora estas sejam importantes questões mundialmente discutidas, poucos trabalhos têm sido publicados a fim de avaliar a estabilidade térmica de antimicrobianos nos alimentos e identificar os possíveis produtos de degradação gerados.

Com a finalidade de estudar o efeito de diferentes condições de tempo/temperatura, mimetizando as condições de pasteurização lenta, rápida e tratamento a ultra-alta temperatura sobre a tilosina em solução e no leite, uma metodologia para a determinação de resíduos de tilosina por LC-MS/MS foi desenvolvida e validada, incluindo nesta, as transições de MRM de possíveis produtos de degradação.

O método analítico desenvolvido baseou-se em uma extração QuEChERS inovadora com detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial triplo quadrupolar (LC-MS/MS), que possibilitou a determinação de tilosina A e outros macrolídeos e a detecção da tilosina B, segundo maior componente da tilosina A. O método, validado para a tilosina, apresentou recuperação global maior que 89,3% em condições de precisão intermediária, com desvio padrão relativo inferior a 12% no intervalo de

concentração de 25 a 75 ng/mL. Os valores de $CC\alpha$, $CC\beta$, limite de detecção e de quantificação foram de 58,35 ng/mL, 71,70 ng/mL, 0,84 ng/mL e 2,79 ng/mL, respectivamente.

Com o tratamento estatístico dos dados obtidos após o processamento térmico da solução padrão de tilosina, foi observada uma redução 2,6% de sua concentração após o processo de pasteurização lenta. Os resultados relativos à pasteurização rápida foram desconsiderados devido à provável evaporação da água da solução acarretando em uma concentração maior que a esperada; e os dados do tratamento UAT não foram possíveis devido à impossibilidade de simulação do tempo/temperatura deste processamento.

Na avaliação da estabilidade da tilosina em leites fortificados tratados termicamente, a maior redução na concentração de tilosina A ocorreu após a pasteurização rápida (13,31%), enquanto na pasteurização lenta e no tratamento UAT essa redução foi de 10,8% e 6,47%, respectivamente. Portanto, a pasteurização rápida se mostrou mais eficaz na degradação da molécula de tilosina que os demais tratamentos, mesmo que em proporções pequenas, e o tratamento UAT se mostrou o menos eficaz para esta finalidade, onde 93,5% da concentração inicial permanecem no leite após este processo.

Através do uso de um equipamento mais sensível, o triplo quadrupolo/tempo-de-voe foi possível identificar as tilosinas A, B, C e D na solução padrão e nos leites fortificados submetidos aos tratamentos térmicos. Além dessas substâncias um metabólito da tilosina foi identificado, a DMT, formada a partir da perda do açúcar micinose da molécula de tilosina A.

Na avaliação da estabilidade da tilosina em solução por LC-Triplo TOF/MS, observou-se uma redução de 1,9% da concentração inicial de tilosina A na pasteurização rápida e 0,4% na pasteurização lenta. Portanto, o processo de pasteurização rápida demonstrou ser mais eficaz na degradação desta molécula, assim como observado nos leites avaliados por LC-MS/MS. Outra importante observação foi o aumento da concentração de tilosina B nos processos de pasteurização rápida e lenta (4,6% e 2,2%, respectivamente) que ocorreu possivelmente devido à perda do açúcar micarose da tilosina A durante esses tratamentos térmicos.

Através deste instrumento foi possível ainda verificar que a DMT estava presente tanto nas amostras brancas de leite quanto nas amostras submetidas aos

tratamentos térmicos, portanto, para verificar o comportamento da DMT frente aos tratamentos térmicos, foi calculada a razão de DMT na amostra de leite processado com o leite branco. O resultado revelou que na pasteurização rápida há formação de maior quantidade desse metabólito que nos demais tratamentos, embora nos outros também tenha sido observado um aumento de DMT.

Contudo, os resultados deste estudo indicam que a molécula de tilosina A apresenta alta estabilidade térmica, embora tenha sido verificada a degradação de uma pequena fração desta com formação de outros produtos de degradação, dentre eles a tilosina B e a DMT. Para as questões de Vigilância Sanitária, esses dados são importantes para a avaliação da exposição humana a esse antimicrobiano, já que nenhum processo comercial de tratamento térmico é eficaz na eliminação deste analito no leite. Além disso, embora os produtos de degradação sejam formados em pequenas proporções, não se sabe a toxicidade destes compostos. Estudos relatam que alguns produtos de degradação de compostos químicos podem ser ainda mais tóxicos que as moléculas originais, porém, estes riscos ainda não são considerados pela legislação atual.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O método desenvolvido para a determinação de resíduos de tilosina em leite será validado para os demais analitos incluídos no estudo de seletividade, para que possa ser utilizado em um futuro monitoramento de resíduos de macrolídeos em leite.

Mais estudos para a identificação de outros produtos de degradação por LC-Triplo TOF/MS serão realizados no leite, a fim de se obter dados relativos à estabilidade da tilosina.

REFERÊNCIAS

AB SCIEX. **Quantitation and Identification of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCP) in Environmental Samples using Advanced Triple TOF® MS/MS Technology**. Ontario, 2010. Disponível em: <<http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/Quantitation-Identification-Pharmaceuticals-Personal-Care-Products-%28PPCP%29-Environmental-Samples.pdf>>. Acesso em: 04 fev. 2014.

ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaios e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p.

AGILENT TECHNOLOGIES. Proven approaches for today's food analysis challenge. Agilent food safety applications notebook: volume 2; Bond Elut QuEChERS. Disponível em :<<http://www.chem.agilent.com/enUS/promotions/Pages/quechersbook.aspx>>. Acesso em: 05/07/2013.

AGUILERA-LUIZ, M.; VIDAL, J.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, vol. 1205, n. 1-2, p. 10-6, 2008.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis**. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. First Action, 2007.

ALTHAUSA R.; BERRUGAB I. M.; MONTEROC A.; ROCAC M.; MOLINAC P. M. Evaluation of a microbiological multi-residue system on the detection of antibacterial substances in ewe milk. **Analytica Chimica Acta**, vol. 632, n. 1, p. 156-162, 2009.

ANASTASSIADES, M. LEHOTAY, S.J. STAJNBAHER, D. SCHENK F.J. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, n. 86, p. 412-431, 2003.

AUSTRALIAN GOVERNMENT, ComLaw. **Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 1.4.2 - Maximum Residue Limits (Australia Only)**. 2013. Disponível em: <http://www.comlaw.gov.au/Details/F2013C00763/Html/Volume_3>. Acesso em: 04 fev. 2013.

Bang-Ce, Y.; Songyang, L.; Peng, Z.; Xiao-Hong, L. Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA. **Food Chemistry**, vol. 106, n. 2, p. 797-803, 2008.

BELTRANE, M. A., JUNIOR, M. M., Principais Riscos Químicos no Leite: um problema de Saúde Pública. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, Umurama, vol. 9, n.2, p.141-145, 2005.

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A.; LAGANA, A.; MASTRANTONI, V. A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolídeo class and lincomycin in bovine milk and yogurt: hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in mass spectrometry**, vol. 21, p.237-246.

BOHM, D. A.; STACHEL, C. S., GOWIK, P. Multi-method for determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, vol. 1216, p. 8217-8223.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil Projeções do Agronegócio 2012/13 a 2022/23. Projeções de Longo Prazo. Assessoria de Gestão Estratégica, Junho de 2013. Disponível em:
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf
Acesso em: 05/01/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União de 7 de julho de 1952. Disponível em: <
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 14 de abril de 2008. Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel Ovos e Pescado do exercício de 2008. Diário Oficial da União de 17 de abril de 2008. Disponível em:
<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18586>>. Acesso em: 2/11/2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº24, de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de julho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, 2011. 73 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf>.

BRASIL. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº14, de 17 de maio de 2012. Proíbe em todo território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial da União de 18 de maio de 2012. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 05/01/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº17, de 29 de maio de 2013. Publica o subprograma de monitoramento em carnes (bovina, aves, suína, equina e de avestruz), leite, pescado, mel e ovos para o exercício de 2013, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Diário Oficial da União de 31 de maio de 2013. Disponível em: < [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013\(FINAL\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2017-2013(FINAL).pdf) > . Acesso em: 05/01/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Crú Refrigerado, o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico de Coleta de Leite Crú Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União de 30 de dezembro de 2011. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 2/11/2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). Diário Oficial da União de 08 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 03/12/2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 808, de 06 de novembro de 2003. Relatório Técnico Final. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/comunicados>>. Acesso em: 05/01/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relatório de Atividades – PAMVet 2004/2005: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet – Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (3º e 4º anos de atividades). Brasília, 2006 p.46. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relat%F3rio_leite_2004-05.pdf> Acesso em: 2/11/2012.

BILANDIZIC N.; KOLANOVIC´ S. B.; VARENINA I.; SCORTICHINI G.; ANNUNZIATA L.; BRSTILO M.; RUDAN N. Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. **Food Control**, vol. 22, n. 12, p. 1941-1948, 2011.

BURKIN, M; GALVIDIS, I. Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay. **Food Chemistry**, vol. 132, n. 2, p. 1080-1086, 2012.

CHAGUNDA, M.G.G.; FRIGGENS, N.C.; RASMUSSEN, M.D.; LARSEN, T. A model for detection of individual cow mastitis based on an indicator measured in milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 89, n. 8, p. 2980-2998, 2006.

CHANDAN, R.C.; KILARA, A.; SHAH, N.P. Dairy Processing & Quality Assurance. Editora Wiley-Blackwell, 600 p., 2008.

CHERLET, M.; BAERE, S.D.; CROUBELS, S.; PACKER, P.D. Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, n. 473, p.167-175, 2002.

CHOPRA, S.; SCHEPDAEL, A.V.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. Characterization of impurities in tylosin using dual liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry. **Talanta**, vol. 16, p. 29-38, 2013.

CHOWDHURY, S. K. **Identification and quantification of drugs, metabolites and metabolizing enzymes by LC-MS**. Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Volume 6. USA: ELSEVIER, 2005. 338 p.

CLARK BS, STOREY MJ. Optimization and validation of a multiclass screening and confirmation method for drug residues in milk using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, vol. 94, n. 2, p. 383-393, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). **European Community Comments on the Proposed Draft Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs (avilamycin, dexamethasone, monensin, narasin, tilmicosin, triclabendazole, tylosin)**. CAC/CCRVDf 11 a 15/05/2009, Natal, Brazil. 3 p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/ifsi/eupositions/ccrdvf/archives/ccrdvf_2009-item5b_en.pdf

COSTA, Diana L. L. B. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para análise multi resíduo de produtos veterinários em leite bovino através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**. Universidade Federal de São Carlos, Instituto de Química Analítica. Dissertação de mestrado em ciências. Química Analítica, 2010.

COSTA, RAFAELA P. **Tilosina: Um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Especialização em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional, 2012.

CPVS-SINDAN, 2013. **Compêndio de Produtos Veterinários - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal**. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html> Acesso em: 3/11/2011.

DUBOIS, M.; FLUCHARD, D.; SIOR, E.; DELAHAUT, Ph. Identification and quantification of five macrolídeo antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography – electrospray tandem spectrometry. **Journal of Chromatography B**, vol. 753, p. 189-202, 2001.

EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012. **Principais países produtores de leite no mundo – 2010**. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/Tabela0212.php>. Acesso em: 4/12/2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines for validation of chemical methods for the FDA Food Program**. Office of foods. Department of Health & Human Services. Version 1.0. 28 February 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Animal Production and Health. FAO supports measures to minimize and contain antimicrobial resistance (AMR)**. Disponível em: http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/news_archive/2011_04_AMR.html. Acesso em: 07/07/2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO/JECFA Monographs n. 2. Residues Evaluation of Certain Veterinary Drugs. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 66th Meeting, 2006. FAO/WHO, 2006. Disponível em: < [http://consumer.fda.gov.tw/Files/doc/Residue%20addendum%20from%2066th%20JECFA%20meeting%20\(2006\).pdf](http://consumer.fda.gov.tw/Files/doc/Residue%20addendum%20from%2066th%20JECFA%20meeting%20(2006).pdf)>. Acesso em: 5/12/2012.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. **International Dairy Journal**, vol 33, p. 38-43, 2013.

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**, vol. 24, n. 7, p. 704-733, 2005.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Editora Manole; 2011.

GRADINARU AC, POPESCU O, SOLCAN G. Antibiotics residues in milk from Moldavia, Romania. **Human and Veterinary Medicine International Journal of the Biofluz Society**, vol. 3, n. 2, p. 133-141, 2011.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid Analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban washwater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, vol. 1292, p. 173-188, 2013.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, LB; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Editora Artmed; 2010.

HAMSCHER, G.; LIMSUWAN, S.; TANSAKUL, N.; KIETZMANN, M.; Quantitative Analysis of Tylosin in Eggs by High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: Residue Depletion Kinetics after Administration via Feed and Drinking Water in Laying Hens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, n. 24, p.9017-9023, 2006.

HOLLIS, A.; AHMED, Z. Preserving Antibiotics, Rationally. **The New England Journal of Medicine**, vol. 369, n. 26, p. 2474-2476, 2013.

HORIE, M.; TAKEGAMI, H.; TOYA, K.; NAKAZAWA, H. Determination of macrolídeo antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, vol. 492, p. 187-197, 2003.

HSIEH, M.K.; SHYU, C.L.; LIAO, J.W.; FRANJE, C.A.; HUANG, Y.J.; CHANG, S.K.; SHIH, P.Y.; CHOU, C.C. Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. **Veterinarni Medicina**, vol. 56, n.6, p.274-285, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos analíticos: DOQ-/cgcre-008**, Ver. 04. Rio de Janeiro, 2001. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 05/01/14.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.136**: Métodos de Análise para Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos: Protocolo de Validação. Rev. 02. Rio de Janeiro, 2013. 59p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5725-1**: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions. Genebre, 1994.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of Chemical Terminology**: Gold Book. Version 2.3.2. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>. Acesso em: 03/01/2014.

IRISH National Accreditation Board. **Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories**. PS15. Issue 3. April de 2012. Dublin: 2012. 36p. Disponível em: < <http://www.inab.ie/media/PS15.pdf>>. Acesso em: 03/01/14.

JUAN, C.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J.; FONT, G. Determination of macrolide and lincosamide antibiotics by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in meat and milk. **Food Control**, n.21, p.1703-1709, 2010.

JÚNIOR, LUIZ S. S. **Tetraciclinas em medicamentos veterinários e produtos lácteos**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos, 2004.

KANFER, I; SKINNER, M. F.; WALKER, R. B. Analysis of macrolide antibiotics. **Journal of Chromatography A**, vol.812, n.1-2, p.255-286, 1998.

KARAMIBONARI AR, MOVASSAGH M. H. Determination of tylosin residues by ELISA in pasteurized milk marketed in Tabriz. **Global Veterinaria**, vol. 6, n. 6, p. 527-529, 2011.

LINAGE, B.; GONZALO, C.; CARRIEDO, J. A.; ASENSIO, J. A.; BLANCO, M. A.; DE LA FUENTE, M. F. e col. Performance of blue-yellow screening test for antimicrobial detection in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 90, n. 12, p. 5370-5379, 2007.

LITTERIO, N.; CALVINHO, L.; FLORES, M.; TARABLA, H.; BOGGIO, J. Microbiological screening test validation for detection of tylosin excretion in milk of cows with low and high somatic cell counts. **Journal of Veterinary Medicine A**, vol, 54, n. 1, p. 30-35, 2007.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; WATTS, J. **Clarke`s Analysis of Drugs and Poisons**. Londres: Ed. Pharmaceutical Press, 4ª Edição, vol 2, 2011. 2736 p.

MOHSENZADEH, M.; BAHRAINIPOUR, A. The detection limits of antimicrobial agents in cow`s milk by a simple yoghurt culture test. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol. 18, n. 11, p. 2282-2285, 2008.

MOVASSAGH M H. Study of antibiotics residues in cow raw milk by copan milk test in Parsabad region, Ardabil province, Iran. **Annals of Biological Research**, vol. 2, n. 4, p. 355-359, 2011.

NAGEL, O. MOLINA, M. P. ALTHAUS, R. Microbiological system in microtrite plates for detections and classification of antibiotic residues in milk. **International Dairy Journal**, vol. 32, n. 2, 2013.

NAGEL O, BELTRÁNB M, BELTRÁNB M, ALTHAUSA R. Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk. **Small Ruminant Research**, vol. 102, n. 1, p. 26-31, 2012.

NAKAJIMA, T.; SASAMOTO, T.; HAYASHI, H.; KANDA, M. TAKEBA, K.; KANAI, S.; KUSANO, T.; MATSUSHIMA, Y.; TAKANO, I. Screening assay of residual antibiotics

in livestock samples by LC-MS/MS. **Food Hygiene and Safety Science.**, vol 53, nº 2, 2012.

NISHA, A.R. Antibiotic residues: a global health hazard. **Veterinary World**, vol. 1, n. 12, p. 375-377, 2008.

PACHECO-SILVA, E.; SOUSA, J.R.; CALDAS, E.D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, vol. 37, n. 1, p. 111-122, 2014.

PAESEN, J. CYPERS, W. PAUWELS, K. ROETS, E. HOOGMARTENS, J. Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 13, p. 1153-1159, 1995.

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

PENG D, SHENGQIANG Y, WANG Y, CHEN D, TAO Y, HUANG L e col. Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of tylosin and tilmicosin in muscle, liver, milk, honey and eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, n. 1, p. 44-51, 2012.

PEREDA, J.A.O.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G. e col. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal**. Volume 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PEREDA, J.A.O.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G. e col. **Tecnologia de Alimentos – Componentes dos Alimentos e Processos**. Volume 1. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

PEREIRA, M. U. **Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por CLAE-EM/EM**. FIOCRUZ, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Monografia de especialização, 2011.

PERES, N.F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, vol. 9, n. 16, 2011. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria16/revisao/RV17.pdf>

PILON, L.; DUARTE, K.M.R. Técnicas para detectar resíduos de antibiótico em leite bovino. **PUBVET**, vol. 4, n. 42, ed. 147, art. 988, 2010.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, vol. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

ROCA, M.; CASTILLO, M.; MARTI, P.; ALTHAUS, R.L.; MOLINA, M.P. Effect of Heating on the Stability of Quinolones in Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 58, p. 5427-5431, 2010.

ROSA, SÉRGIO. Resíduos Antibióticos em Alimentos de Origem Animal. Disponível em: <http://sergiorosa.com.br/blog/2012/08/>. Acesso em: 04/03/2013.

SANLI, S.; SANLI, N.; ALSANCAK, G. Spectrophotometric Determination of Acidity Constants of Some Macrolides in Acetonitrile-Water Binary Mixtures. **Acta Chimica Slovenica**, vol. 57, n. 4, p. 980 – 987, 2010.

SHALABY, M. T.; ABDEL-FATTAH, S. M.; HUSSEIN, M. A.; SAAD, M. M.; KHALIL, M.M.; AHMED, M. B. Domestic thermal processing effect on antibiotic residues in animal food products. **Egypt Journal of Food Science**, vol. 38, p. 97-111, 2010

SHMMIEDER, R.; EDWARDS, R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future Microbiology**, vol. 7, n. 1, p. 73-79, 2012.

SIERRA D.; CONTRERAS A.; SANCHEZ A.; LUENGO C.; CORRALES J. C.; MORALES C. T. e col. Short communication: detection limits of non- β -lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests. **Journal of Dairy Science**, vol. 92, n. 9, p.4200-4206, 2009.

SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. **The Annual Review of Public Health**, vol. 29, p. 151-169, 2008.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, vol. 36, n. 13, p.449-461, 2013.

SOKOL J, POPELKA P, NAJY J. Determination of tylosin in food animal origin by liquid chromatography. **Folia Veterinaria**, vol. 54, n. 3, p. 167-171, 2010.

SOUTO, C.R.O. **Síntese total e enantiosseletiva da aglicona do antibiótico (+)-10-desoximetimicina**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Tese de Doutorado em Química, 1998.

SPISSO, B. F. **Efeitos do processamento térmico sobre antibióticos ionóforos poliéteres em níveis residuais em tecidos de frangos alimentados com rações medicadas**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Projeto de Exame de Qualificação para o Doutorado, 2006.

SPISSO, B.F. *e col.* Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, n.682, p. 82–92, 2010.

SPISSO, B.F.; FERREIRA, R.G.; PEREIRA, M.U.; MONTEIRO, M.A.; CRUZ, T.A.; COSTA, R.P.; LIMA, A.M.B.; NÓBREGA, A.W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a single solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, vol. 682, n. 1-2, p. 82-92, 2010.

SPISSO, B. F.; MONTEIRO, M. A. Curso de capacitação em introdução à LC-MS/MS para análise de resíduos em alimentos. INCQS/Rio de Janeiro, 2013.

STOLKER A.; RUTGERS P.; OOSTERINK E.; RUTGERS J.; PETERS R.; RHIJN J.; NIELEN, M. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC–ToF-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 391, n. 6, p. 2309-2322.

SU P., LIU N., ZHU M., NING B., LIU M., YANG Z. *e col.* Simultaneous detection of five antibiotics in milk by high-throughput suspension array technology. **Talanta**, vol. 85, n. 2, p. 1160-1165, 2011.

THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods**.2013. Disponível em: <<http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>>. Acesso em 04 fev. 2013.

THE MERCK INDEX 15TH EDITION. O'Reil, M.J. Ed.: Pharmabooks; 2708 p., 2013.

THE MERCK VETERINARY MANUAL. Mastitis in cattle: an overview. Disponível em: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/110902.htm>. Acesso em: 20/01/2012.

TICONA, E. M. **Determinação experimental das características de transferência de calor de um gerador de pasta de gelo**. PUC-Rio. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Mecânica, 2007. Disponível em: <http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/10513/10513_5.PDF>.

TANG, Y. Y.; LU, H. F.; LIN, H. Y.; SHIH, Y. C.; HWANG, D. F. Multiclass of 23 veterinary drugs in milk by ultraperformance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, vol. 881-882, p. 12-19, 2012.

TONG, J.; RAO, Q; ZHU, K.; JIANG, Z; DING, S. Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. **Journal of Separation Science**, vol. 32, n. 23-24, p. 4254-4260, 2009.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, vol. 4, n. 10, 2008. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL74.pdf>

TURNIPSEED, B. S.; ANDERSEN, C. W.; KARBIWNYK, M. C.; MADSON, R. M.; MILLER, E. K. Multi-class, multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 22, n. 10, p. 1467-1480, 2008.

UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão nº 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao dispositivo na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, n. L221, p.8-36, 2002.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 2821/98 do conselho de 17 de dezembro de 1998. Altera, no que diz respeito à retirada da autorização de certos antibióticos, a Diretiva 70/524/CEE relativa aos aditivos na alimentação para animais. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, n. L351, p.4-8, 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Leite Longa Vida – UHT**. [2013]. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5216/material_didatico/leite_UHT.pdf>. Acesso em 04 fev. 2014.

VIDAL M. L. J.; FRENICH G. A.; AGUILERA-LUIZ M. M.; ROMERO-GONZÁLEZ R. 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**, vol. 397, n. 7, p. 2777-2790, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Vocabulário internacional de metrologia: Conceitos fundamentais e gerais de termos associados (VIM)**, 1 ed. Luso-brasileira. Rio de Janeiro, 2012.

WANG, J.; LEUNG, D. Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 21, n. 19, p. 3213-3222, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. Report of the Second WHO Expert Meeting; 29–31 May 2007; Copenhagen. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf> Acesso em: 21 de novembro de 2011.

WHO HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain veterinary drug residues in food: seventieth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. Seventieth report of FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 21-29 Oct 2008; Geneva. 2008. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_954_eng.pdf>. Acesso em: 21 de novembro de 2011.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE list of antimicrobials of veterinary importance. 2007. Disponível em: <http://www.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf> Acesso em: 21 de novembro de 2011.

ZORRAQUINO, M.A.; ALTHAUS, R.L.; ROCA, M.; MOLINA, M.P. Heat treatment on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in Milk. **Journal of Food Protection**, v.74, n.2, p.311-315, 2011.