



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



1150059494

 IQ
T/UNICAMP Si38f

**Farmacocinética e determinação de resíduos de
enrofloxacina e seu metabólito em tecidos de
frangos**

Tese de doutorado apresentada
por **Regiane Gregório da Silva** ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química Analítica da Universidade
Estadual de Campinas, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Campinas, 2004

UNIDADE	IV
Nº CHAMADA	T/UNIV
V	EX
TOMBO BC/	59494
PROC.	16/17-04
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,012
DATA	13-9-04
Nº CPD	

306 10 221722

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Si38f

Silva, Regiane Gregório da.

Farmacocinética e determinação de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito em tecidos de frangos / Regiane Gregório da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Susanne Rath.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Enrofloxacin. 2. Ciprofloxacina. 3. Frangos.
4. CLAE. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu marido, pelo carinho e estímulo dados durante toda caminhada até aqui.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Instituto de Química, pela possibilidade de realização deste trabalho;

Às agências de fomento FINEP/RECOPE e CNPQ pelo auxílio financeiro, e à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e do projeto de pesquisa;

À minha orientadora Profa. Dra. Susanne Rath, pela amizade e apoio constante;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Felix G.R. Reyes, pela amizade, auxílio e estímulo;

Ao Prof. Dr. José Eduardo Butolo, pela sua colaboração desde a elaboração do projeto à realização do experimento com as aves;

Ao Prof. Dr. José Roberto Sartori e aos alunos de pós - graduação do Laboratório de Nutrição de Aves, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu - SP, pela condução do experimento com os frangos de corte;

Ao Synchrophar, em especial ao Dr. Ronilson A. Moreno e ao Dr. Antônio Amarante, pelas sugestões e auxílio no tratamento estatístico dos dados farmacocinéticos.

Aos amigos (as): Luciane, Vera, Regiane F., Raquel, Marili, Marcelo N., Jonas, Eduardo, Mônica, Silvane, Elede, Marcelo F., Kadu, Paula, Gabriella, Socorro, Jamil, Janaína, Luciana, Gyda e Adilson, pelo companheirismo durante os últimos quatro anos.

Curriculum Vitae

Nome: Regiane Gregório da Silva.

Endereço: Rua Perdiz, n.º 425. Conj. Ney Braga. CEP: 87087- 040. Maringá-PR.

E-mail: regianegs@yahoo.com.br

Formação acadêmica:

Doutorado em Ciências - Área: Química Analítica

Título da tese: "Farmacocinética e determinação de enrofloxacina e seu metabólito em tecidos de frangos".

Instituição: Departamento de Química Analítica/ Instituto de Química/ UNICAMP

Início: 02/2000 - Término 05/2004

Mestrado em Química Aplicada - Área: Produtos do Meio Ambiente

Título da dissertação: "Efeitos de dietas diferenciadas sobre a composição físico-química e perfil de ácidos graxos do músculo *Longissimus dorsi* em novilhas terminadas em confinamento".

Instituição: Departamento de Química/ UEM

Início: 03/1998 - Término: 02/2000

Graduação:

Curso: Química - Habilitação: Bacharelado

Instituição: Departamento de Química/ UEM

Início: 03/1994 - Término: 02/1998

Artigos em revista científica indexada:

SILVA, R. G. da; MOREIRA, F. B.; PRADO, I. N.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. de. "Diets and genetic groups effects on the muscle composition and fatty acid profile of heifers fattened in feedlot", *Acta Scientiarum.*, v.out., *in press*, 2003.

SILVA, R. G. da; PRADO, I. N.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. de. "Dietary effects on muscle fatty acid composition of finished heifers", Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB), v.37, n. 1, p. 95-101, jan 2002.

Apresentação de trabalhos em eventos de natureza técnico-científica:

SILVA, R. G. da; REYES, F. G. R.; RATH, S. "Determinação de enrofloxacin e ciprofloxacina em carne de frango por cromatografia líquida de alta eficiência", sessão de painéis, durante o Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, realizado no Centro de Convenções da Universidade Estadual de Campinas, de 03 a 06 de novembro de 2003.

SILVA, R. G. da; REYES, F. G. R.; RATH, S. "Cromatografia líquida por par iônico na determinação de fluoroquinolonas", sessão coordenada e painéis, durante a 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), realizada em Poços de Caldas, MG, de 20 a 23 de maio de 2002. Livro de Resumos n. QA-108.

SILVA, R. G. da; PRADO, I. N.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. de. "Avaliação da mandioca e seus resíduos industriais em substituição ao milho - Efeitos sobre a composição muscular e perfil de ácidos graxos de novilhas confinadas", sessão de painéis, durante o IV SLACA, realizado na Universidade Estadual de Campinas, de 12 a 15 de novembro de 2001. Livro de Resumos p. 363.

SILVA, R. G. da; REYES, F. G. R.; RATH, S. "Determinação de norfloxacina em medicamentos, por análise por injeção em fluxo", sessão de painéis, durante o 11º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), realizado em Campinas-SP, de 18 a 21 de setembro de 2001. Livro de resumos n. IA-5.

SILVA, R. G. da; REYES, F. G. R.; RATH, S. "Determinação de danofloxacina em medicamentos de uso veterinário, por análise por injeção em fluxo", sessão de painéis, durante a 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), realizada em Poços de Caldas, MG, de 28 a 31 de maio de 2001. Livro de Resumos n. QA-057.

Resumo

FARMACOCINÉTICA E DETERMINAÇÃO DE ENROFLOXACINA E SEU METABÓLITO EM TECIDOS DE FRANGOS

Palavras chave: *enrofloxacin, ciprofloxacin, antimicrobianos, resíduos de medicamentos veterinários, farmacocinética, frangos, CLAE.*

A enrofloxacin (EFX) é um antimicrobiano sintético do grupo das fluoroquinolonas, amplamente empregado na medicina veterinária e, em particular, na avicultura, tendo como principal metabólito a ciprofloxacin (CFX). As análises por CLAE foram realizadas empregando uma coluna analítica de fase mista octadecil-trocador catiônico e como fase móvel, tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN com eluição por gradiente, a uma vazão de 1 mL min^{-1} . A quantificação nas análises de medicamentos, plasma e músculo foi realizada por padronização interna, mediante uso da ofloxacin (OFX) e detecção da EFX e CFX em 278 nm e OFX em 294 nm. O preparo de amostra do plasma e dos tecidos consistiu na precipitação das proteínas com ácido tricloroacético 10 %/ACN (80/20 v/v), seguida de extração em fase sólida em cartucho de fase mista octadecil-trocador catiônico. O método foi validado mediante avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação do método, precisão intra e inter-ensaios, exatidão, seletividade e robustez. O limite de quantificação para ambas fluoroquinolonas foi de 200 ng mL^{-1} para plasma, $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para fígado e $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para músculo e rim. O método mostrou-se adequado para determinação de EFX e CFX em formulações farmacêuticas, assim como para determinação de EFX e CFX em plasma e tecidos de frangos. Os parâmetros farmacocinéticos foram avaliados em frangos da linhagem Cobb, após administração oral de 10 mg de EFX/kg de peso corpóreo. O gráfico concentração plasmática *versus* tempo é característico de um modelo de dois compartimentos, com uma concentração plasmática máxima e tempo para alcançar esta concentração de $1,5 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $9 \pm 2 \text{ h}$, respectivamente. A área sob a curva (ASC) foi calculada em $35 \pm 4 \text{ } \mu\text{g h mL}^{-1}$. O tempo médio de residência foi de 15,64 h. Níveis de resíduos de EFX e CFX foram determinados em tecidos de músculo, fígado e rim de frangos de corte após administração oral de 10 mg de EFX/kg de peso corpóreo em dose única diária por 3 dias consecutivos, com um tempo de carência de 3, 5 e 7 dias anterior abate. Foi verificado que um período de carência no mínimo de 7 dias antes da última dose de aplicação do medicamento é apropriado para essa linhagem de frango, quando a carne é destinada ao consumo humano.

Abstract

PHARMACOKINETICS AND DETERMINATION OF ENROFLOXACIN AND ITS METABOLITE IN CHICKEN TISSUES

Key words: *enrofloxacin, ciprofloxacin, antimicrobials, residues of veterinary drugs, pharmacokinetic, chickens, HPLC.*

Enrofloxacin (EFX) is a synthetic fluoroquinolone antimicrobial agent widely employed in veterinary medicine, particularly in poultry. Its major metabolite is ciprofloxacin (CFX). The HPLC analyses were carried out using a cationic-octadecyl mixed column and a 0.05 mol L⁻¹ (pH 2.5) phosphate buffer/ACN as mobile phase, with a linear elution gradient and a flow rate of 1 mL min⁻¹. The quantification was carried out employing ofloxacin (OFX) as internal standard and detection of EFX and CFX at 278 nm and OFX at 294 nm. The sample preparation of plasma and chicken tissues consisted of the precipitation of proteins with 10 % trichloroacetic acid /ACN (80/20 v/v) followed by solid phase extraction on cationic-octadecyl mixed cartridges. The method was validated using the following parameters: linear range, linearity, selectivity, sensitivity, detection and quantification limits, intra- and inter-day precisions, accuracy and robustness. The limits of quantification, for both fluoroquinolonas, were 200 ng mL⁻¹ for plasma, 200 µg kg⁻¹ for liver and 100 µg kg⁻¹ for muscle and kidney tissues. The validated method was adequate for the determination of EFX and CFX in pharmaceutical formulations, as well as for the quantification of these substances in plasma and chicken tissues. The pharmacokinetic parameters of EFX were evaluated in broiler chickens (Cobb) after a single oral administration of 10 mg of EFX/kg body weight. The resulting plasma concentration *versus* time graph was characteristic of a two-compartment open model, with a maximum plasma concentration and time to reach this concentration of 1.5 ± 0.2 mg mL⁻¹ and 9 ± 2 h, respectively. The half-life and the mean residence time of EFX were 1.5 ± 0.2 h and 15.64 h, respectively. The area under the curve (AUC) was calculated as 35 ± 4 mg h mL⁻¹. The average residence time was 15.64 h. Residue levels of EFX and CFX were determined in muscle, liver and kidney tissues of broiler chickens after oral administration of 10 mg of EFX/kg of body weight once daily for 3 successive days, with a preslaughter time of 3, 5 and 7 days. It was verified that a preslaughter withdrawal time of 7 days is appropriate for this animal destined for human consumption.

Sumário

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
I.1 - Avicultura	1
I.2 - Antimicrobianos na produção animal	2
I.3 - Quinolonas e fluoroquinolonas	5
I.4 - Enrofloxacina	9
I.4.1 - Propriedades físico-químicas	9
I.4.2 - Modo de ação	9
I.4.3 - Cinética e biotransformação	10
I.4.4 - Estudo da toxicidade	13
I.4.5 - Indicadores de uso na medicina veterinária	13
I.4.6 - Níveis de resíduos	14
I.5 - Aspectos de legislação	16
I.6 - Metodologia analítica	18
CAPÍTULO II - OBJETIVOS	28
CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS	29
III.1 - Materiais	29
III.1.1 - Equipamentos	29
III.1.2 - Colunas cromatográficas	30
III.1.3 - Cartuchos para extração em fase sólida	30
III.1.4 - Solventes e reagentes	30
III.1.5 - Medicamentos de uso veterinário	31
III.2 - Preparo de soluções	31
III.2.1 - Tampão fosfato de sódio	31
III.2.2 - Soluções estoque de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina	32
III.2.3 - Soluções de trabalho de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina	32

III.2.4 - Soluções de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina para construção de curvas analíticas.	32
III.3 - Procedimento Experimental	33
III.3.1 - Desenvolvimento do método cromatográfico	33
III.3.1.1 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia líquida por par iônico	33
III.3.1.2 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia em fase reversa/troca iônica	34
III.3.1.3 - Condições cromatográficas para a separação de EFX, CFX e OFX	35
III.3.1.4 - Estabilidade da EFX e da CFX em solução	35
III.3.2 - Medicamentos de uso veterinário	36
III.3.2.1 - Validação do método para determinação de EFX em medicamentos	36
III.3.3 - Desenvolvimento e validação do método para determinação de EFX e CFX em plasma de frango	38
III.3.3.1 - Preparo de amostras de plasma	38
III.3.3.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma de frango	40
III.3.3.3 - Análise de amostras de plasma	42
III.3.4 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango	43
III.3.4.1 - Preparo de amostras de músculo	43
III.3.4.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango	43
III.3.5 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango	44
III.3.5.1 - Preparo de amostras de fígado	44
III.3.5.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango	45

III.3.6 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango	46
III.3.6.1 - Preparo de amostras de rim	46
III.3.6.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango	46
III.3.7 - Ensaio com frangos de corte	47
III.3.7.1 - Ensaio farmacocinético com frangos de corte	52
III.3.7.1 - Ensaio para a determinação de níveis de resíduos em músculo, fígado e rim	54
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
IV.1 - Desenvolvimento do método cromatográfico	56
IV.1.1 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia líquida por par iônico	57
IV.1.2 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia em fase reversa/troca iônica	62
IV.1.3 - Condições cromatográficas para separação de OFX, CFX e EFX	65
IV.1.4 - Estabilidade da EFX e da CFX em solução	68
IV.2 - Medicamentos de uso veterinário	68
IV.2.1 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em medicamentos	69
IV.3 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma de frango	76
IV.3.1 - Preparo de amostra de plasma	76
IV.3.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma de frango	78
IV.4 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango	84
IV.4.1 - Preparo de amostra de músculo	84
IV.4.2 - Validação do método para a determinação de EFX e	

CFX em músculo de frango	85
IV.5 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango	89
IV.5.1 - Preparo de amostra de fígado	89
IV.5.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango	90
IV.6 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango	95
IV.6.1 - Preparo de amostra de rim	95
IV.6.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango	96
IV.7 - Ensaio com frangos de corte	100
IV.7.1 - Ensaio farmacocinético com frangos de corte	101
IV.7.2 - Ensaio para a determinação de EFX em músculo, fígado e rim	
IV.7.2.1 - Níveis residuais de EFX e CFX no músculo do peito de frango	110
IV.7.2.2 - Níveis residuais de EFX e CFX em fígado de frango	111
IV.7.2.3 - Níveis residuais de EFX e CFX em rim de frango	113
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	114
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

Lista de abreviaturas

ACN - Acetonitrila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCA - Ácido tricloroacético
ASC - Área sob a curva
CE - Comunidade Européia
CFX - Ciprofloxacina
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
 C_{max} - Concentração plasmática máxima
COCC - Canadian Organic Certification Cooperative
CVM - Centro de Medicina Veterinária
DAD - Detector de arranjo de fotodiodos
 DL_{50} - Dose letal
EFS - Extração em fase sólida
EFX - Enrofloxacin
ELL - Extração líquido-líquido
FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA - Food and Drug Administration
FE - Fase estacionária
FM - Fase móvel
FQ - Fluoroquinolonas
ICH - International Conference on Harmonization
IDA - Ingestão diária aceitável
JECFA - Joint Expert Committee of Food Additives
LMR - Limites máximos de resíduos
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
MAA - Ministério da Agricultura e Abastecimento
MeOH - Metanol

MIC - Concentração inibitória mínima

p.c. - Peso corpóreo

PAMVet - Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em
Alimentos de Origem Animal

PCRBC - Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Carne

PNCRB - Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

$t_{1/2}$ - Tempo de meia-vida

TMR - Tempo médio de residência

USDA - Departamento de Agricultura dos EUA

USP - United States Pharmacopoeia

UV/VIS - Ultravioleta/Visível

V_d - Volume de distribuição

WHO - World Health Organization

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Evolução da avicultura de corte no Brasil nos últimos anos.	2
Tabela 2 - Procedimentos experimentais empregados na EFS.	39
Tabela 3 - Composição percentual e valores calculados das rações.	49
Tabela 4 - Peso médio das aves dos grupos controle, farmacocinético e nível de resíduos.	50
Tabela 5 - Cronograma empregado para realização do ensaio farmacocinético com as aves.	52
Tabela 6 - Cronograma empregado para realização do ensaio com níveis de resíduos com as aves.	55
Tabela 7 - Efeito da composição da fase aquosa/orgância da FM sobre os parâmetros cromatográficos.	59
Tabela 8 - Efeito da variação da concentração do par iônico adicionado à fase móvel, sobre os parâmetros cromatográficos na separação de EFX e CFX.	59
Tabela 9 - Efeito do pH sobre os parâmetros cromatográficos na separação de EFX e CFX.	60
Tabela 10 - Efeito da composição da fase aquosa/orgância da FM sobre os parâmetros cromatográficos.	63
Tabela 11 - Efeito do pH sobre os parâmetros cromatográficos de EFX e CFX.	64
Tabela 12 - Separação das FQ na condição otimizada com eluição por gradiente.	67
Tabela 13 - Teste de adequabilidade do sistema cromatográfico.	67
Tabela 14 - Estudo da degradação da EFX.	70
Tabela 15 - Figuras de mérito do processo de validação (faixa linear, sensibilidade e linearidade).	72
Tabela 16 - Precisão intra-ensaio e inter-ensaio para uma concentração do analito de 0,500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.	74

Tabela 17 - Resultados obtidos na determinação de EFX nos medicamentos de uso veterinário A e B, concentração declarada de 100 mg mL ⁻¹ .	75
Tabela 18 - Recuperação de EFX e CFX em plasma utilizando cartuchos Narc-2.	77
Tabela 19 - Resultados dos testes de recuperação de EFX e CFX em plasma de aves.	83
Tabela 20 - Recuperação de EFX e CFX em músculo empregando EFS com cartuchos Narc-2.	84
Tabela 21 -Determinação de EFX e CFX adicionados ao músculo de animais do grupo controle.	89
Tabela 22 - Recuperação de EFX e CFX em fígado utilizando cartuchos Narc-2.	90
Tabela 23 - Determinação de EFX e CFX adicionados ao fígado de animais do grupo controle.	94
Tabela 24 - Recuperação de CFX e EFX em rim utilizando cartuchos Narc - 2.	95
Tabela 25 - Determinação de EFX e CFX adicionados ao rim de animais do grupo controle.	99
Tabela 26 - Parâmetros farmacocinéticos calculados para cada animal do grupo III.	106
Tabela 27 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos da EFX reportados na literatura para frangos de corte.	107
Tabela 28 - Concentração de EFX e CFX determinada em músculo dos animais do ensaio com níveis de resíduo.	110
Tabela 29 - Concentração de EFX e CFX determinada em fígado dos animais do estudo dos níveis de resíduos.	112
Tabela 30 - Concentração de EFX e CFX determinada em rim dos animais do estudo dos níveis de resíduos.	113

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do ácido nalidíxico.	5
Figura 2- Estruturas de algumas fluoroquinolonas.	7
Figura 3 - Estrutura da enrofloxacin (A) e ciprofloxacina (B).	9
Figura 4 - Parâmetros cromatográficos.	34
Figura 5 - Sistema a vácuo empregando a EFS	39
Figura 6 - Procedimento de extração das FQ do plasma.	42
Figura 7 - Homogeneizador Ultra - Turrax.	43
Figura 8 - Aves da linhagem Cobb, com 1 dia de vida.	47
Figura 9 - Gaiolas em sala com controle de temperatura e umidade.	50
Figura 10 - Ave da linhagem Cobb, com 42 dias de vida.	51
Figura 11 - Obtenção do plasma das amostras de sangue coletadas.	53
Figura 12 - Tecidos coletados das aves.	55
Figura 13 - Estruturas e equilíbrio de ionização da EFX.	56
Figura 14 - Cromatograma de separação da EFX e CFX, 1,00 µg mL ⁻¹ . Fase móvel: Tampão fosfato de sódio, pH 2,5/ACN (85/15 v/v), HTBA 5 mmol L ⁻¹ . Vazão 1 mL min ⁻¹ . Fase estacionária C ₁₈ Lichrocart.	58
Figura 15 - Mecanismo de separação sugerido utilizando a CLPI.	62
Figura 16 - Cromatogramas obtidos na otimização da FM para separação da EFX e CFX (A, B e C, condições especificadas na Tabela 10).	63
Figura 17 - Cromatogramas obtidos na otimização da FM para separação da CFX da EFX (A, B, C e D, condições especificadas na Tabela 10).	64
Figura 18 - Estruturas da ofloxacin (OFX), norfloxacina (NFX) e perfloxacina (PFX).	65

- Figura 19 - Cromatograma da separação da OFX, CFX e EFX com a FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN, gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE C18-catiônica. 66
- Figura 20 - Cromatograma 3D da separação da OFX, CFX e EFX obtido nas condições descritas na Figura 19. 66
- Figura 21 - Cromatogramas da EFX após degradação com: 1) Aquecimento; (2) HCl 0,1 mol L⁻¹; (3) NaOH 0,1 mol L⁻¹ e (4) H₂O₂ 3 % v/v. 70
- Figura 22 - Gráficos das cinco curvas analíticas feitas em dias diferentes, para CFX e EFX, utilizando o padrão interno OFX. 71
- Figura 23 - Cromatograma do branco do plasma. FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE: C18-catiônica. 79
- Figura 24 - Cromatograma 3D da separação da OFX, CFX e EFX obtido nas condições descritas na Figura 23. 80
- Figura 25 - Cromatograma do extrato do plasma com adição de 0,500 µg mL⁻¹ de OFX, CFX e EFX. FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE: C18-catiônica. 80
- Figura 26 - Curva analítica com adição de EFX, CFX e OFX ao plasma do grupo controle. 81
- Figura 27 - Cromatograma do extrato do branco do músculo. FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE C18-catiônica. 85

- Figura 28 - Cromatograma do extrato do músculo com adição de 0,500 $\mu\text{g g}^{-1}$ de OFX (t_R 7,76) e 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ de CFX e EFX (t_R 8,59 e 9,34). FM tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE: C18-catiônica. 86
- Figura 29 - Curva analítica com adição da EFX e CFX a amostras de músculo do grupo controle. 87
- Figura 30 - Cromatograma do extrato do branco do fígado FM tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica. 91
- Figura 31 - Cromatograma do extrato do fígado com adição de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CFX e EFX. FM tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica. 92
- Figura 32 - Curva analítica com adição da EFX e CFX a amostras de fígado do grupo controle. 93
- Figura 33 - Cromatograma do extrato do branco do rim FM tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica. 96
- Figura 34 - Cromatograma do extrato do rim com adição 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CFX e EFX. FM tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica. 97
- Figura 35 - Curva analítica com adição de CFX e EFX ao rim do grupo controle. 98

Figura 36 - Perfil farmacocinético das aves (n=7) após administração oral de 10 mg de EFX/kg p.c.	102
Figura 37 - Perfil farmacocinético da EFX (10 mg/kg p.c.) após aplicação em frangos de corte (n=7).	103
Figura 38 - Gráfica do log da concentração versus tempo.	105
Figura 39 - Gráfica do log da concentração versus tempo da fase de eliminação da curva farmacocinética.	105

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 - Avicultura

A produção de carne de frango vem apresentando um aumento contínuo na participação no mercado mundial de carnes, sendo, atualmente, a segunda carne mais produzida e consumida. Pelas projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), entre 1998 e 2004, a participação da carne de frango no mercado mundial deve aumentar de 24 para 28 % ao mesmo tempo em que ocorrerá uma queda na participação da carne bovina de 29 para 26 % e na carne suína de 47 para 46 % (AVISITE, 2004).

No Brasil, a avicultura de corte experimentou um crescimento extraordinário nos últimos trinta anos. Na década de 70, o consumo de carne de frango era de 2,3 quilos/habitante/ano. Em 2003 o consumo passou para 32,36 quilos/habitante/ano levando o Brasil a ocupar a terceira posição entre os maiores consumidores de carne de frango do mundo, ficando à frente da União Européia e perdendo apenas para os EUA e China.

O Brasil é, ainda, o terceiro maior produtor (novamente perdendo apenas para os EUA e a China) e é o segundo maior exportador mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos EUA. A Tabela 1 relaciona a população brasileira e a evolução da avicultura de corte nos últimos cinco anos.

O aumento na produção, exportação e consumo de carne de frango nacional foram acompanhados pelas adaptações das instalações das granjas e por uma evolução nos parâmetros zootécnicos como genética, nutrição, sanidade e manejo das aves.

Tabela 1 - Evolução da avicultura de corte no Brasil nos últimos anos.

ANO	PRODUÇÃO mil toneladas	EXPORTAÇÃO mil toneladas	DISPONIBILIDADE INTERNA mil toneladas	CONSUMO PER CAPITA kg/hab.
1999	5.526,0	770,5	4.755,4	28,32
2000	5.980,6	906,7	5.073,9	29,82
2001	6.567,2	1.249,3	5.317,9	30,85
2002	7.449,0	1.599,9	5.849,1	33,49
2003	7.645,1	1.922,0	5.723,1	32,36

Fonte: AVISITE (2004).

I.2 - Antimicrobianos na produção animal

Na produção animal, para que seja fornecido aos animais um alimento balanceado e que seja nutricionalmente completo, faz-se necessário que sejam incluídos aditivos na dieta para assegurar que os nutrientes sejam ingeridos, digeridos, protegidos da destruição, absorvidos e transportados às células do organismo (BUTOLO, 1999). Entre os grupos de aditivos utilizados na produção animal está o grupo dos promotores de crescimento, que podem ser compostos sintéticos orgânicos, compostos químicos ou elementos inorgânicos simples.

Os antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) são compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos, sendo utilizados na produção animal para (i) tratar enfermidades (terapêutico), (ii) prevenir contra enfermidades causadas pela presença de organismos patogênicos (profilático) e (iii) melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (promotores de crescimento) (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

Os antimicrobianos são administrados aos animais por via intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral (na alimentação ou água), tópica (na pele ou couro) e por infusões intramamária ou intrauterina. Teoricamente, independente da via de administração, podem ocorrer resíduos nos alimentos de origem animal como carne, leite e ovos (MITCHELL et al., 1998).

A presença de resíduos de antimicrobianos nos tecidos e alimentos de origem animal pode ocorrer por não terem sido seguidas as boas práticas veterinárias, tais como: uso do medicamento em espécies diferentes das que se destina, aumento da dose recomendada, uso por período de tempo maior que o recomendado e uso por via de administração diferente daquela recomendada. Ainda, a presença de resíduos pode ocorrer se não for respeitado o período de carência, que é o intervalo de tempo entre a última administração do medicamento e a eliminação do fármaco e de seus produtos de biotransformação até níveis aceitáveis como seguros para o consumidor (MITCHELL et al., 1998).

Há controvérsias sobre a afirmação de que a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos animais destinados ao consumo humano, contribua para induzir resistência aos antibióticos, assim como transferência de bactérias resistentes aos animais para o homem.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que qualquer antimicrobiano usado para promoção de crescimento dos animais deve ser banido se for utilizado na terapia humana ou se for conhecido que há resistência cruzada com antibióticos usados na medicina humana (MILTENBURG, 2000).

Embora não tenha sido possível estabelecer evidências concretas de risco à saúde humana associado a essas substâncias, alguns países, independentemente destes estudos, têm tomado decisões que visam banir o uso de antibióticos e quimioterápicos em dietas para animais destinados ao consumo humano (BELLAYER, 1999).

Em 1970, a Agência Norte-Americana de Alimentos e Medicamentos (FDA - *Food and Drug Administration*), estabeleceu um comitê permanente para avaliar a eficácia dos antimicrobianos na produção animal, resultando em 1972, na retirada da penicilina e tetraciclina das listas de aditivos. A mesma medida foi adotada pela Comunidade Européia em 1976 (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

O governo da Suécia, em 1986, impôs o banimento de antimicrobianos como promotores de crescimento, sendo que os antibióticos e quimioterápicos somente poderiam ser empregados na produção animal com o propósito de prevenção ou terapia de doenças (BUTOLO, 1999).

No Brasil, pela Portaria nº 193 de 12/05/98, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SDA/MAPA), a penicilina, a clortetraciclina e a oxitetraciclina, foram proibidas para uso como promotores de crescimento (BRASIL, 1998a). Ainda, mediante Portaria nº 448 do SDA/MAPA, foram proibidos a fabricação, importação e uso do cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona (BRASIL, 1998b). No entanto, não fica garantido que a proibição elimina o uso, uma vez que há deficiência na fiscalização de venda e de uso de aditivos.

Em 1997, a Comunidade Européia (CE), através da medida de precaução (Directiva 97/6/CE), proibiu o uso da avoparcina por associar seu uso à existência de enterococos resistentes a vancomicina. Logo, foram proibidas a bacitracina de zinco, a tilosina, a espiramicina e a virginiamicina (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

A Comissão Canadense de Certificação de Produção Animal Orgânica (COCC - Canadian Organic Certification Cooperative) estabeleceu, entre outros aspectos, a proibição do uso intencional de esterco e de promotores de crescimento, tais como antibióticos, hormônios, uréia e elementos traços, utilizados para estimular o crescimento através da alimentação animal (BELLAYER, 1999).

Nos EUA, a pressão pela eliminação de aditivos como antimicrobianos na alimentação animal é grande. Está sendo estudado o banimento dos promotores de crescimento: penicilina, tetraciclina, eritromicina, lincomicina, tilosina, bacitracina e virginiamicina. Esse quadro somente poderá ser revertido se os laboratórios farmacêuticos provarem que a utilização subterapêutica destes antibióticos não oferece riscos à saúde humana.

Em 31/10/2000, o Centro de Medicina Veterinária (CVM) dos EUA propôs a proibição do uso das fluoroquinolonas (FQ) enrofloxacin (EFX) e sarafloxacin em frangos. O motivo seria evitar a indução de resistência bacteriana em humanos. Por exemplo, através da ingestão de carne procedente de animais tratados com FQ contra infecções causadas pela *Escherichia coli*, poderia haver resistência em humanos a *Camphylobacter*, que não é letal em frangos (FDA, 2001). Até o momento apenas o uso da sarafloxacin foi suspenso.

Apesar de haver uma tendência mundial no sentido da proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, o uso dessas substâncias para fins terapêuticos deve continuar na produção animal, visto que epidemias podem rapidamente disseminar-se numa criação, principalmente tratando-se de aves domésticas, provocando alta mortalidade e levando a elevados prejuízos econômicos. Todavia, o uso destes medicamentos veterinários requer informações detalhadas sobre suas propriedades farmacocinéticas, incluindo análise de resíduos em alimentos de origem animal.

I.3 - Quinolonas e fluoroquinolonas

As seguintes classes de antimicrobianos são comumente usadas na produção animal, sendo administradas via ração e água: beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinoxalinas, sulfamídeos e quinolonas. Dentre estes, um número elevado de produtos contendo quinolonas e fluoroquinolonas foi aprovado e disponibilizado comercialmente para uso animal (ROSE et al., 1998).

O ácido nalidíxico (1-etil-1,4-diidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-ácido carboxílico), cuja estrutura está apresentada na Figura 1, foi a primeira quinolona obtida em laboratório por Leshner et al., em 1962. Esta quinolona é ativa contra a maioria das bactérias Gram-negativas, com exceção das *Pseudomonas aeruginosa*, mas é inativa contra todos os microorganismos Gram-positivos (KALANT e ROSCHLAU, 1991).

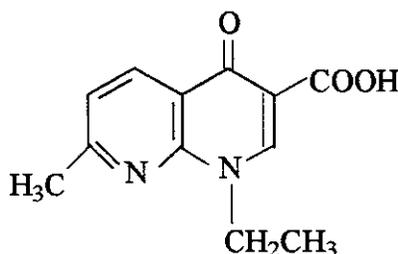
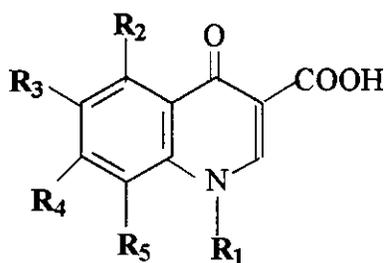


Figura 1 - Estrutura do ácido nalidíxico.

Inicialmente, o uso das primeiras quinolonas como ácido nalidíxico, ácido oxolínico e cinoxacina, era restrito por apresentar espectro de atividade limitado e, visto que não atingiam níveis antibacterianos sistêmicos, eram úteis apenas como anti-sépticos urinários (KATZUNG, 1995). Conseqüentemente, outras quinolonas foram sendo sintetizadas e testadas de forma a ampliar o espectro antibacteriano e a utilidade destes fármacos.

O ácido pipemídico foi a primeira quinolona a mostrar alguma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* devido a inclusão do grupo piperazinila na posição 7 da molécula do ácido nalidíxico. A flumequina foi a primeira quinolona com um átomo de flúor adicionado à posição 6, mas sem a presença do grupo piperazinila (BAYER, 1995).

As FQ, (Figura 2) são antimicrobianos sintéticos de segunda geração, derivadas das quinolonas, contendo um átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinila na posição 7, os quais são responsáveis por uma maior atividade antibacteriana e menor toxicidade do que as quinolonas de primeira geração. As FQ são altamente ativas contra uma ampla faixa de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo aquelas resistentes a antibióticos beta-lactâmicos e sulfonamidas. Estas características fazem com que estes fármacos sejam utilizados na terapia de uma ampla faixa de infecções (POSYNIAK et al., 1999).



Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ácido Oxolínico	- C ₂ H ₅	H	- O -	CH ₂ - O -	H
Norfloxacin	- C ₂ H ₅	H	F		H
Ofloxacin		H	F		- O -
Danofloxacin		H	F		H
Sarafloxacin		H	F		H
Difloxacin		H	F		H
Enrofloxacin		H	F		H
Ciprofloxacin		H	F		H

Figura 2 - Estruturas de algumas fluoroquinolonas.

A inclusão do átomo de flúor nas quinolonas de primeira geração aumentou a atividade do fármaco contra patógenos Gram-positivos, como *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Já o grupo piperazinila melhorou a eficácia quanto a organismos Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, e *Salmonella enteritidis* (ROYBAL et al., 1997).

As FQ são usadas em medicina veterinária principalmente para o tratamento de infecções pulmonares, urinárias e digestivas (DELEPINE et al., 1998). Elas têm contribuído significativamente na terapia de várias infecções respiratórias e intestinais em aves, sendo também utilizadas no tratamento de bovinos, suínos, cães e gatos (POSYNIK et al., 1999).

A atividade antimicrobiana das quinolonas está relacionada com a inibição da síntese de DNA bacteriano, inibindo a DNA-girase (KATZUNG, 1995).

As quinolonas e seus derivados são geralmente bem absorvidos no local de administração e no trato digestivo. A biotransformação e excreção diferem entre os derivados, mas eles podem ser eficientemente biotransformados e excretados por ambas as rotas, hepática e renal (JOHNSTON et al., 2002).

Dados experimentais indicam que a distribuição das FQ em tecidos animais é rápida e as concentrações alcançadas são maiores que os níveis plasmáticos correspondentes. Ainda, possuem atividade bactericida e micoplasmal a baixas concentrações. A concentração inibitória mínima (MIC) para EFX e CFX contra patógenos está na faixa de 0,001 - 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RAO et al., 2002b).

Entre as quinolonas e fluoroquinolonas para uso na avicultura destacam-se: ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, enoxacina, enrofloxacina, flumequina, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico e sarafloxacina (ROSE et al. 1998). Dentre as FQ, a enrofloxacina e a sarafloxacina, eram permitidas para uso na avicultura nos EUA. Todavia, recentemente, a sarafloxacina foi proibida (FDA, 2001). No Japão, são aprovadas para uso em animais as FQ benofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina e ofloxacina (HORIE et al., 1994). Na América Latina são utilizadas para uso veterinário as seguintes FQ: enrofloxacina, danofloxacina e norfloxacina (BAYER, 1995; WHO, 1998).

I.4 - Enrofloxacin

I.4.1 - Propriedades físico - químicas

A EFX, (ácido ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-3-quinoleína carboxílico) (Figura 3A) é um antimicrobiano sintético da classe das FQ, de emprego exclusivo na medicina veterinária. Após administração, o composto perde um grupo etila *in vivo* formando a ciprofloxacina, CFX (Figura 3B). Cabe destacar que a ciprofloxacina é um antimicrobiano farmacologicamente ativo usado na medicina humana. Entretanto, é utilizada na medicina veterinária em vários países, entre esse a Argentina (GARCIA-OVANDO et al., 1999).

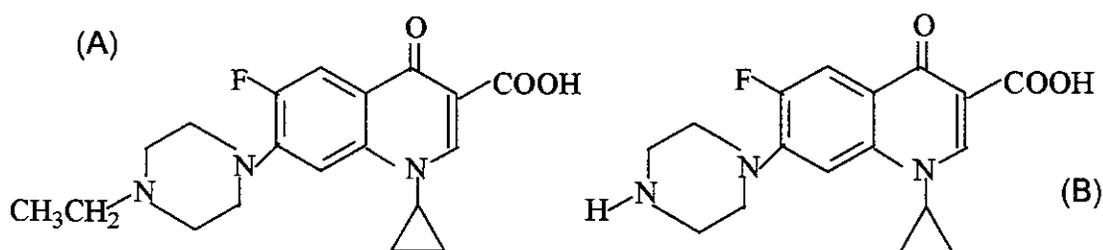


Figura 3 - Estrutura da enrofloxacin (A) e ciprofloxacina (B).

A fórmula molecular da EFX é $C_{19}H_{22}FN_3O_3$, com massa molar de 359,40. É uma substância cristalina, de cor amarelo pálido, com ponto de fusão de 219-221 °C. A solubilidade em água é dependente do pH e como há grupos ácidos e básicos na mesma molécula, a solubilidade aumenta em pH menores que 5,0 e maiores que 10 (MERCK INDEX, 1989; ALTREUTHER, 1987).

I.4.2 - Modo de ação

Enquanto que penicilinas, cefalosporinas e a bacitracina agem atacando as paredes celulares das bactérias e aminoglicosídeos, o cloranfenicol, as tetraciclina e os macrolídeos interferem com a síntese de proteínas, os derivados das quinolonas,

como a EFX, diminuem a atividade da DNA-girase, enzima importante na replicação do DNA, cuja inibição induz a distúrbios funcionais com bloqueio de um número indeterminado de estágios da síntese do DNA, resultando na morte da bactéria (SCHEER, 1987).

I.4.3 - Cinética e biotransformação

Estudos com EFX mostraram que esta quinolona possui biodisponibilidade de 65 - 70 % após aplicação oral (ANADÓN et al., 1995). Este composto é ponto de referência para a maioria das FQ usadas na avicultura por ser o mais conhecido.

Tanto a EFX como a CFX têm alta biodisponibilidade em fluídos corpóreos e órgãos, alta razão de concentração tecido/soro e boa tolerância (GARCÍA-OVANDO et al., 1999; POSYNIK et al., 1999).

Quando se trata de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal, é necessário dar uma atenção especial sobre a distribuição do fármaco nos tecidos animais, sua rota de biotransformação, sua eliminação e a dos produtos de biotransformação. O tempo de eliminação deve ser utilizado para prever a quantidade do fármaco acumulado após doses múltiplas e o tempo necessário para reduzir a concentração no sangue a concentrações seguras. Os dados farmacocinéticos são usados para estabelecer períodos de carência, e as informações sobre absorção, distribuição, biotransformação e excreção são utilizadas para estabelecer os LMR de antimicrobianos (ANADÓN e MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 1999).

A disponibilidade cinética da EFX foi determinada em frangos (GARCÍA-OVANDO et al. 1999; KNOLL et al., 1999; ANADÓN et al., 1995), em suínos e coelhos (MANCEAU et al., 1999), em cabras (RAO et al., 2002a; RAO et al., 2002b) e em peixes (INTORRE et al., 2000; LEWBART et al., 1997). Entretanto, no Brasil não existem dados farmacocinéticos disponíveis sobre a EFX e outras FQ em frangos de corte. Os parâmetros farmacocinéticos determinados pelos autores citados foram: concentração plasmática máxima (C_{max}); tempo de meia-vida ($t_{1/2}$);

tempo médio de residência (TMR); área sob a curva (ASC) e volume de distribuição (V_d).

Anadón et al. (1995) determinaram as propriedades farmacocinéticas da EFX em frangos da linhagem Hubbard x Hubbard, após administração oral e intravenosa de doses de 10 mg/kg de p.c. por 4 dias. Após administração oral o C_{max} atingido pela EFX em 1,64 h foi de 2,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os $t_{1/2}$ de eliminação do plasma foram de 14,23 e 10,29 h e os TMR foram de 15,30 e 9,65 h, após administração oral e intravenosa, respectivamente. A biodisponibilidade oral calculada foi de 64 %.

García-Ovando et al. (1999) administraram dose intravenosa de 5 mg kg^{-1} p.c. de EFX e de CFX em frangos. Cabe destacar que a CFX é utilizada na medicina veterinária em vários países. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados e diferenças significativas ($p < 0,001$) foram encontradas para os dois fármacos. O V_d foi de 1,98 L kg^{-1} para EFX e de 4,04 L kg^{-1} para CFX. A ASC, TMR e $t_{1/2}$ foram duas vezes maiores para EFX quando comparados para a CFX. Estes resultados indicam que a CFX é eliminada mais rapidamente que a EFX, podendo apresentar a vantagem de um período de carência menor.

Knoll et al. (1999) compararam a disponibilidade cinética da EFX com a danofloxacina em frangos após administração oral e intravenosa usando doses de 10 e 5 mg kg^{-1} p.c. para EFX e danofloxacina, respectivamente. Os parâmetros farmacocinéticos que foram similares para danofloxacina e EFX foram: $t_{1/2} \sim 6-7$ h e TMR $\sim 6-9$ h. Mas, a depuração (24 e 10 $\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$) e o V_d (10 e 4 L kg^{-1}) foram duas vezes maiores para danofloxacina que para EFX. A C_{max} após administração oral foi de 0,50 e 1,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para danofloxacina e EFX, respectivamente, com um t_{max} de 1,5 h para ambas. A biodisponibilidade da danofloxacina foi de 99 % contra 89 % da EFX.

Manceau et al. (1999) plotaram o gráfico da concentração plasmática *versus* tempo, após administração intravenosa de 5 mg kg^{-1} p.c. de EFX em suínos. Foram detectadas concentrações de CFX abaixo do limite de quantificação do método (0,040 $\mu\text{g mL}^{-1}$), exceto no tempo 0,5 h no qual a concentração de CFX

correspondeu a menos que 4 % do total. A concentração de EFX no plasma, após 12 h da administração do medicamento, foi de $0,094 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rao et al. (2002b) determinaram as propriedades farmacocinéticas da EFX após administração oral em cabras, com dose única de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ p.c. A curva construída para avaliar o perfil farmacocinético da EFX apresentou uma fase rápida de distribuição e uma fase lenta de eliminação, com $t_{1/2}$ de 0,73 h. O V_d , a depuração sistêmica e o TMR encontrados foram de $1,38 \text{ L kg}^{-1}$, $1331 \text{ mL h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ e 0,97 h, respectivamente. A EFX e CFX foram detectadas no plasma após 3 h da administração da EFX com a soma das concentrações maiores que $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Lewbart et al. (1997) determinaram as propriedades farmacocinéticas da EFX em peixes (*Colossoma brachypomum*) após administração intramuscular e oral com dose de 5 mg kg^{-1} , e por imersão em banho com dose de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ por 5 h. O $t_{1/2}$ determinado para EFX, após administração intramuscular foi de 28,9 h, sendo mais longo que para animais de outras espécies. Após 4 h o C_{max} foi de $1,64 \mu\text{g mL}^{-1}$, tendo excedido a concentração inibitória mínima (MIC) para 20 bactérias conhecidas por induzir infecções em peixes. Após 48 h a concentração da EFX estava bem acima da MIC para patógenos Gram negativos em peixe. A administração oral produz uma C_{max} de $0,94 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um $t_{1/2}$ de 6 a 8 h. No banho por imersão, o C_{max} foi de $0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 2 h após o início do tratamento. A administração intramuscular é a mais indicada, alcançando níveis séricos maiores do que pelas outras vias de administração.

Intorre et al. (2000) determinaram em peixes (*Dicentrarchus labrax*), a disposição cinética da EFX no plasma e a sua distribuição nos tecidos. Após administração oral de 5 mg kg^{-1} p.c., a EFX foi lentamente eliminada em 25 h, com C_{max} de $1,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 8 h. A distribuição da EFX foi feita no compartimento extravascular, com concentrações no fígado maiores que no músculo e na pele. O tratamento por imersão em banho ($5, 10$ ou 50 mg L^{-1} por 4, 8 ou 24 h) resultou em níveis no plasma e nos tecidos com correlação significativa com a concentração do fármaco na água ou com o tempo de exposição ao mesmo. A CFX foi detectada no

fígado, ocasionalmente no plasma, mas nunca no músculo e pele dos peixes (*Dicentrarchus labrax*).

I.4.4 - Estudos de toxicidade

A EFX foi amplamente investigada quanto a sua segurança de uso por Altreuther (1987), que avaliou a segurança de uso farmacológico, toxicidade aguda e subcrônica, embriotoxicidade, teratogênese e mutagênese. Efeitos adversos em animais de laboratório (ratos, macacos e porcos) somente apareceram quando a dose aplicada excedeu em 10 vezes a dose terapêutica recomendada. Estudos toxicológicos não indicam influência em parâmetros de sistemas vitais como no sistema nervoso central ou no cardiovascular. Testes *in vitro* para verificar as propriedades alergênicas não apresentaram efeitos. Estudos em ratos mostram que a EFX não é teratogênica ou mutagênica.

A toxicidade aguda oral e parenteral da EFX é considerada baixa. Altreuther (1987) determinou a toxicidade aguda após administração oral da EFX em ratos, macacos e coelhos. A dose letal (DL_{50}) determinada foi: $\geq 5000 \text{ mg kg}^{-1}$ p.c. em ratos (as) e em macacos; 4336 mg kg^{-1} p.c. em macacas; 500 a 800 mg kg^{-1} p.c. em coelhos (as). Após administração parenteral a DL_{50} foi de aproximadamente 200 mg kg^{-1} p.c. em macacos (as). A toxicidade subcrônica foi avaliada mediante administração do fármaco na ração, diariamente por 13 semanas, em duas espécies, ratos e cachorros. As doses toleradas foram de 2000 mg do fármaco por kg de ração, equivalente a $165 \text{ mg EFX/kg}^{-1}$ p.c. em ratos e 52 mg kg^{-1} p.c. em cachorros.

I.4.5 - Indicações de uso na medicina veterinária

EFX e CFX são efetivas contra uma variedade de bactérias patogênicas, tais como *Pausterella multocida*, *Yersinia spp.*, *Escherichia coli*, *Haemophilis somnus*, *Moraxella bovis* e *Samonella spp.* (RAO et al., 2002a). Suas principais aplicações

têm sido no tratamento de infecções gastrointestinais e respiratórias causadas por bactérias Gram negativas (RAO et al., 2002b).

As propriedades antimicrobiais da EFX indicam que existem vantagens para uso em frangos. O principal uso destes produtos ocorre no tratamento de infecções micoplasmiais, colibacilosis respiratórias secundárias e pasteurellosis em frangos e perus (ANADÓN et al., 1995).

Para uso em frangos a EFX é formulada para administração oral através da água, utilizando uma solução 10 % m/v, com a dose indicada de 10 mg/kg de p.c. por dia. Deve ser administrada por 3 dias consecutivos para tratamento de *micoplasmas* e de *E. coli.*, sendo indicada sua aplicação por 5 dias consecutivos nos casos de *Samonellose*.

Para não correr riscos de permanecerem resíduos da EFX ou de seu metabólito, CFX, no leite, não é indicado o uso deste antimicrobiano em mamíferos em fase de lactação. Do mesmo modo, o medicamento não deve ser administrado em poedeiras, para que não sejam transmitidos resíduos para os ovos.

1.4.6 - Níveis de resíduos

Os resíduos de medicamentos veterinários tornam-se um problema de segurança alimentar quando persistem em um nível acima do valor considerado seguro no momento do abate dos animais. Portanto, é fundamental que estejam disponíveis informações sobre as propriedades farmacocinéticas, assim como, estudos sobre níveis de resíduos dos fármacos em animais destinados ao consumo humano.

Anadón et al. (1995) determinaram resíduos de EFX e de seu principal metabólito, CFX, em músculo, rim, fígado, pulmões, gordura e pele de frangos da linhagem Hubbard x Hubbard, que receberam dose oral de EFX de 10 mg/kg de p.c. por 4 dias consecutivos. Os animais foram separados em três grupos e abatidos 1, 6 e 12 dias após a última dose administrada do medicamento. Os resultados indicam que os resíduos de EFX e CFX foram eliminados lentamente. Concentrações médias de CFX em músculo, fígado e rim variaram de 20 a 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$, persistindo 12 dias

após a última aplicação do medicamento. Todavia, neste período de 12 dias, a EFX só foi detectada em fígado na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os autores concluíram que um período de carência de 12 dias deveria ser respeitado após a última administração do medicamento até o abate.

Knoll et al. (1999) determinaram a concentração de EFX nos tecidos de frangos após administração oral $10 \text{ mg de EFX/kg de p.c.}$, adicionados na água, durante um período de 5 dias. Os seguintes tecidos foram analisados: fígado, rim, pulmão, traquéia, miocárdio, músculo, pele, paredes do ceco e plasma. A concentração plasmática máxima foi de $0,52 \mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações nos tecidos excederam a concentração no plasma, com a razão tecido/plasma variando de 1,1 a 7,0. Neste estudo, as concentrações de CFX em plasma foram determinadas e ficaram abaixo do limite de quantificação do método, ou seja $0,07 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Gorla et al. (1997) determinaram EFX e CFX em ovos, após administração oral de uma solução 5 % m/v de cada um dos dois medicamentos, na dosagem de 5 mg kg^{-1} p.c. por dia, durante 5 dias consecutivos em 12 poedeiras. Os ovos foram coletados no período de 14 dias a contar do 1º dia de administração dos medicamentos. Os antimicrobianos foram determinados nas gemas e nas claras. Os resíduos de EFX detectados nos ovos foram entre 20 e $1980 \mu\text{g kg}^{-1}$, com a maior concentração sendo atingida no 7º dia após o início da administração do medicamento. A CFX foi detectada entre 140 e $280 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo detectada a partir do 4º dia da administração do medicamento. A partir de 7 e 6 dias do término da administração do medicamento, as concentrações de EFX e CFX, respectivamente, não foram mais detectadas ($<\text{LOD} = 19 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tyczkowska et al. (1994) administraram, intravenosamente, uma dose de $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ p.c. de EFX em vacas lactantes. Durante 48 h após a administração do medicamento, foram coletadas nove amostras de leite e plasma a fim de monitorar as concentrações de EFX e de CFX. A EFX rapidamente é excretada no leite e atinge a concentração máxima de $0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 30 min da administração do medicamento. Tanto no leite como no plasma, não é possível quantificá-la ($\text{LOQ} < 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 4 h da administração. A CFX aparece rapidamente no plasma e

no leite (15 min após injeção intravenosa da EFX) sugerindo uma biotransformação rápida da EFX em CFX. No leite a CFX atinge uma concentração máxima de 0,41 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 4 h, quando começa a decair, não sendo mais detectada no leite e no plasma após 48 h. É importante ressaltar que apenas um animal foi utilizado neste estudo.

1.5 - Aspectos de legislação

Para garantir a segurança dos consumidores, níveis de tolerância ou Limites Máximos de Resíduos (LMR) têm sido estabelecidos quanto à presença de antimicrobianos em alimentos de origem animal. Estes níveis de tolerância são estabelecidos para os níveis residuais do fármaco e de seus metabólitos, que podem permanecer na carcaça animal ou nos alimentos de origem animal após o término da administração do medicamento e do período de carência até o abate.

O risco à saúde humana devido à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos é avaliado pelo Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares, JECFA (*Joint Expert Committee of Food Additives*). Nessas avaliações, são levados em consideração todos os dados disponíveis na literatura sobre parâmetros biológicos e toxicológicos do antimicrobiano em questão (PALERMO NETO, 1999).

O JECFA, na sua 48ª reunião em 1997, estabeleceu um valor de ingestão diária aceitável (IDA) para EFX, de 0 - 2,0 $\mu\text{g/kg}$ de p.c./dia (FAO, 2001).

Os LMR, definitivos ou temporários, adotados pelo Brasil, são os harmonizados no Mercosul ou os recomendados por organismos internacionais como o *Codex Alimentarius* e a Comunidade Européia.

Na legislação brasileira foi estabelecido o LMR para as FQ em tecidos de frango adotando os valores recomendados pela Comunidade Européia como valores de LMR para resíduos de EFX e CFX em tecidos de frango (EUROPEAN COMMISSION REGULATION 90/2377/ECC) um total (EFX + CFX) de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para músculo e pele/gordura, 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para fígado e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para rim (EUROPEAN COMMISSION REGULATION 99/508/ECC).

O Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCRB) foi instituído no Brasil pela Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os objetivos gerais do PNCRB são melhorar a produtividade e qualidade dos alimentos de origem animal, visando a segurança do consumidor e proporcionar ao país condições de adequar, do ponto de vista sanitário, a produção de alimentos às regras internacionais de comércio. O plano prevê a adoção de programas setoriais para carne, mel, leite e pescado (BRASIL, 1999)

Alguns antimicrobianos são monitorados pelo Programa de Controle de Resíduos Biológicos em Carne (PCRBC), cujas ações estão direcionadas para evitar a violação dos LMR de substâncias autorizadas e verificar a presença de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país. Os antimicrobianos avaliados foram: penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina, clortetraciclina, sulfonamidas e outros, como ivermectina, nitrofurazona, furazolidona e nicarbazina (BRASIL, 1999).

Em março de 1999, a Comissão Veterinária da Comunidade Européia (CE) visitou o Brasil para avaliar as ações tomadas pelas autoridades brasileiras para atender as directivas 96/22, 96/23 e 98/140 do conselho da CE, que pedem o controle de resíduos nos animais vivos e nos produtos destinados à exportação para a CE. O relatório concluiu que do ponto de vista de organização administrativa, o controle de resíduos é satisfatório, mas apresenta deficiência nas informações gerais e na frequência de amostragem. Nas deficiências graves foram constatados falta de controle de distribuição de medicamentos veterinários, o qual aumenta o risco da presença de resíduos nos alimentos (MILTENBURG, 2000).

Recentemente, em reunião realizada em 11/09/03 na diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foi criado o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. O monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos estava sendo acompanhado e desenvolvido pela ANVISA desde 2002 (ANVISA, 2004).

O PAMVet prevê o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal expostos ao consumo. A implementação do programa será de forma escalonada no território nacional. Serão coletadas amostras no comércio e os resíduos analisados nos laboratórios selecionados e credenciados pela ANVISA.

Através da resolução RDC nº 5 de 02/02/01, a ANVISA criou o regulamento técnico sobre métodos de amostragem para o PAMVet. Para que nas amostras de alimentos analisadas seja encontrada uma violação (nível de resíduos superior aos LMR estabelecidos), com um nível de confiança de 95%, devem ser analisadas no mínimo 299 amostras. No ano de 2003 foram analisadas 434 amostras de leite bovino coletadas no comércio das regiões sul e sudeste. Os resultados ainda não foram apresentados.

Gradativamente, outros alimentos de origem animal serão analisados. Além do leite bovino, serão analisadas: carne de frango, carne bovina, carne suína, pescado, ovos de galinha e mel de abelha. A análise de amostras de carne de frango está prevista para 2004. Os seguintes antimicrobianos serão avaliados pelo PAMVet: benzilpenicilina/benzilpenicilina procaína; diidroestreptomicina/estreptomicina, neomicina, eritromicina, tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, ampicilina, amoxicilina, ceftiofur; cloranfenicol, sulfametazina/sulfametoxina e sulfatiazol.

Apesar das FQ serem utilizadas na medicina veterinária no Brasil, o PAMVet não prevê a avaliação da presença dos resíduos destes fármacos e de seus metabólitos em alimentos de origem animal.

I.6 - Metodologia analítica

É necessário que seja realizado o controle de qualidade dos alimentos de origem animal quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com sensibilidade adequada para quantificar a presença de resíduos de antimicrobianos nos tecidos de animais destinados à produção de alimentos como carne, ovos e leite. Até o

momento, praticamente não existem informações na literatura sobre a determinação de resíduos de fluoroquinolonas em alimentos de origem animal no Brasil.

Na determinação de resíduos de antimicrobianos em alimentos deve ser dada uma atenção especial ao preparo da amostra que antecede a análise instrumental. O preparo da amostra envolve, além da extração líquido-líquido (ELL) dos antimicrobianos das matrizes, etapas de extração, limpeza do extrato (*clean-up*) e pré-concentração do analito utilizando cartuchos de extração em fase sólida (EFS).

De modo geral, os métodos de preparo de amostras sugeridos na literatura para determinação de FQ em materiais biológicos requerem procedimentos de extração líquido-líquido com: solventes puros, como acetonitrila (JOHNSTON et al., 2002 e GORLA et al., 1997); solventes com soluções básicas: acetonitrila-hidróxido de sódio (TYCZKOWASKA et al., 1994) e acetonitrila-amônia (HORMAZABAL et al., 1991); solventes com soluções ácidas: metanol-ácido tricloroacético (CINQUINA et al., 2003), acetonitrila-ácido fosfórico (CHU et al., 2002), acetonitrila-ácido tricloroacético (POSYNIAK et al., 2001 e 1999), acetonitrila-ácido acético (ROSE et al., 1998), metanol-ácido perclórico-ácido fosfórico (STRELEVITZ e LINHARES, 1996) e acetonitrila-ácido metafosfórico (HORIE et al., 1994).

Diversos métodos analíticos são descritos na literatura para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Para a determinação de antimicrobianos da classe das quinolonas, tem sido recomendado empregar métodos que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, eletroforese capilar, espectrofotometria e voltametria.

Cabe destacar que, para a determinação de resíduos de antimicrobianos da classe das quinolonas e fluoroquinolonas, o método mais comum é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores UV/VIS, arranjo de fotodiodos (DAD) ou fluorescência. Para confirmação da identidade, a cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massas (LC-MS) é o mais indicado.

A seguir serão revisados trabalhos da literatura relacionados à determinação de FQ em plasma e tecidos de animais, utilizando a CLAE. Esses trabalhos foram fonte de pesquisa para o desenvolvimento da metodologia analítica para determinação de EFX e CFX em plasma e tecidos de frangos neste trabalho.

Garcia-Ovando et al. (1999) utilizaram a CLAE com detector UV para quantificar EFX e CFX em plasma de frangos e assim comparar seus parâmetros farmacocinéticos. A detecção foi efetuada no λ_{\max} de 278 nm. As proteínas do plasma foram precipitadas com ACN e após centrifugação, o sobrenadante foi coletado, evaporado, ressuspendido em fase móvel (FM) e injetado no cromatógrafo após ser filtrado. Uma coluna C_{18} foi utilizada na separação dos antimicrobianos com a FM composta de H_2O/ACN /triethylamina (80/19/1 v/v). Os LOQ calculados para EFX e CFX em plasma foram 0,010 e 0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Knoll et al. (1999) quantificaram EFX e danofloxacin em plasma e tecidos de frangos empregando a CLAE com detector de fluorescência. A EFX e a danofloxacin foram extraídas do plasma com uma solução de tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} , pH 2,2. Os tecidos foram homogeneizados com ácido metafosfórico 0,2 % v/v em uma mistura H_2O/ACN (70/30 v/v). Os dois extratos foram purificados em cartucho C_{18} . A fase estacionária (FE) utilizada foi uma coluna C_{18} (LiChrospher 100) e a composição da FM foi H_3PO_4 85 %/triethylamina/ H_2O/ACN (0,3/0,3/81/18,4 v/v/v/v). A detecção foi feita nos comprimentos de excitação e emissão de 446 e 278 nm, respectivamente. Os LOQ calculados para as FQ em plasma e nos tecidos foram, respectivamente: 0,060 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para EFX; 0,020 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para CFX; 0,060 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para danofloxacin.

Anadón et al. (1995) determinaram EFX e CFX em plasma e tecidos de frangos utilizando a CLAE, sendo que o detector utilizado não foi mencionado. Os analitos foram extraídos com diclorometano. Após centrifugação, a fase orgânica foi evaporada e o extrato redissolvido na FM cuja composição era H_2O com 1,9 mL de H_3PO_4 85 % e 1,4 g de iodeto de tetrabutilamônio/MeOH (70/30 v/v). A FE utilizada na separação da EFX e CFX foi uma coluna Nucleosil C_{18} . O LOD determinado pelos autores para as duas FQ foi de 3 ng mL^{-1} .

Gorla et al. (1997) utilizaram a CLAE com detector UV para determinar EFX e CFX em gemas e claras de ovos. As matrizes foram homogeneizadas com acetonitrila. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado, evaporado e dissolvido na FM. Foi empregada como FE uma coluna cromatográfica Hypersil ODS e como

FM, H₂O/ACN/trietilamina (80/19/1 v/v). A detecção dos analitos foi feita em λ_{max} de 275 nm. Os LOD do método foram 19 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para EFX e 156 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para CFX.

Cinquina et al. (2003) otimizaram e validaram metodologia analítica empregando a CLAE/DAD na determinação de EFX e CFX em leite de cabra. Os analitos foram extraídos do leite após precipitação das proteínas com ácido tricloroacético 20 % em MeOH e com adição de tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,4. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a EFX extraída utilizando discos C₁₈. A separação cromatográfica foi feita utilizando uma coluna C₁₄ (Zorbax Bonus-RP) e uma FM composta de H₃PO₄ 0,05 mol L⁻¹ (pH 3,4)/ACN (87/13 v/v). A detecção foi efetuada em 277 nm. O LOQ calculado para os dois analitos foi 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tyczkowaska et al. (1994) determinaram EFX e CFX em plasma e leite bovino utilizando a CLAE/DAD. A detecção foi monitorada entre 230 - 350 nm, com quantificação em 278 nm. O preparo de amostra consistiu em homogeneizar volumes iguais de plasma ou leite com ACN/NaOH 0,1 mol L⁻¹ (50/50 v/v) e separar as fases por um sistema de micro separação. O ultrafiltrado foi injetado diretamente no cromatógrafo. A FE utilizada foi uma coluna fenil (Spherisorb) e a FM composta de ACN/MeOH/trietilamina/H₂SO₄/H₂O (9/9/0,45/0,40/81,15 v/v/v/v/v). O LOD calculado para os dois compostos foi de 5 ng mL⁻¹.

Gigosos et al. (2000) determinaram EFX, CFX, norfloxacin, difloxacin e marbofloxacin em amostras de rim e músculo bovino e em ovos por CLAE/DAD. O monitoramento dos analitos foi efetuado entre 190-350 nm com quantificação em 280 nm. A extração das FQ foi efetuada com HCl 1,0 mol L⁻¹. Após centrifugação, o sobrenadante foi purificado utilizando cartucho C₁₈. Na separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C₁₈ (Hypersil BDS) e a FM composta por H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,5)/ACN (85/15 v/v). Os LOD variaram de 1 ng para EFX e CFX, 2 ng para norfloxacin e difloxacin, e 4 ng para marbofloxacin.

A CLAE com detecção por fluorescência foi utilizada na determinação de resíduos de EFX e CFX, entre outras FQ, em ovos (CHU et al., 2002); em tecidos animais (RAMOS et al., 2003; GARCIA et al., 2001; GARCIA-OVANDO et al., 2000;

POSYNIAK et al., 2001 e 1999; YORKE e FROC, 2000; STRELEVITZ e LINHARES, 1996; HORIE et al., 1994; HORMABAZAL et al., 1991) e em leite (ROYBAL et al., 1997).

Chu et al. (2002) determinaram EFX, CFX e sarafloxacin em clara e gemas de ovos utilizando a CLAE com detector de fluorescência. As matrizes foram acidificadas com H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ seguido por precipitação das proteínas com ACN. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado, pré-concentrado e o resíduo ressuspenso com tampão fosfato de sódio, pH 2,5, anterior análise cromatográfica. A FM utilizada na separação foi ácido trifluoroacético 0,1 %/ACN (75/25 v/v) e a FE uma coluna polimérica, PLRP-S. A detecção foi feita nos comprimentos de excitação e emissão de 460 e 280 nm, respectivamente. Os LOD determinados para as claras foram $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os 3 antimicrobianos estudados e para as gemas, 3, 1 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para CFX, EFX e SFX, respectivamente.

Ramos et al. (2003) utilizaram a CLAE com detector de fluorescência para determinar EFX, CFX, sarafloxacin, ácido oxolínico e flumequina em músculo de suínos e de salmão. As FQ foram extraídas do músculo com tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e filtrado. A limpeza do extrato foi feita empregando cartucho C_{18} (Discovery DS). A separação cromatográfica foi efetuada separadamente para EFX, CFX e sarafloxacin, com tampão fosfato de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0)/ACN (82:18 v/v) como FM e detecção nos comprimentos de excitação e emissão de 450 e 280 nm, respectivamente. Para o ácido oxolínico e a flumequina a FM empregada foi tampão fosfato de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0)/ACN (66:34 v/v) e a detecção nos comprimentos de excitação e emissão de 366 e 312 nm, respectivamente. Foi utilizada uma coluna Symmetry C_{18} como FE nas duas separações. O LOD determinado foi de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todas FQ, exceto para sarafloxacin que foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Garcia et al. (2001) determinaram EFX e CFX em músculo e fígado de frangos utilizando a CLAE/fluorescência. As FQ foram extraídas com tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 seguida por extração líquido-líquido com diclorometano. Após centrifugação, a fase orgânica foi coletada e concentrada para injeção

cromatográfica. A FE empregada na separação da EFX e CFX foi uma coluna C₁₈ (Novapak) e a FM composta de tampão fosfato/ACN (80/20 v/v), sendo o tampão: KH₂PO₄ 0,02 mol L⁻¹, H₂SO₄ 0,006 mol L⁻¹ e brometo de tetraetilamônio 0,012 mol L⁻¹. A detecção foi efetuada nos comprimentos de excitação e emissão de 425 e 338 nm, respectivamente. Os LOD determinados para os tecidos foram de 32 µg kg⁻¹ para CFX e 10 µg kg⁻¹ para EFX.

Garcia-Ovando et al. (2000) utilizaram a CLAE com detector de fluorescência para determinar a EFX em músculo de frango. A EFX foi detectada nos comprimentos de excitação e emissão de 440 e 297 nm, respectivamente. A extração da EFX do músculo foi feita com diclorometano após o tecido ter sido homogeneizado com tampão fosfato. Após a centrifugação a fase orgânica foi coletada, filtrada, evaporada e ressuspensa em FM, anterior análise cromatográfica. As condições cromatográficas foram: FE C₁₈ (ODS Hypersil) e FM composta de H₂O/ACN/trietilamina (80/19/1 v/v), com pH ajustado em 3,0 com H₂SO₄. O LOQ determinado para a EFX foi de 3,9 µg kg⁻¹.

Posyniak et al. (1999) quantificaram EFX, CFX, sarafloxacin e difloxacin em músculo, fígado e rim de bovinos e suínos, empregando a CLAE com detecção por fluorescência. Na extração dos analitos da matriz foi utilizada uma solução de ácido tricloroacético 5 %/ACN (70/30 v/v). Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e purificado por EFS com cartucho de estireno divinilbenzeno (SDB1). As FQ foram separadas empregando coluna analítica C₈ (LiChrospher 100) e a FM composta de H₃PO₄ 25 mmol L⁻¹/ACN (70/30 v/v) com 2,5 mmol L⁻¹ de ácido heptanosulfônico. A detecção foi feita nos comprimentos de excitação e emissão de 440 e 278 nm, respectivamente e a confirmação de identidade por detector de arranjo de fotodiodos em 278 nm. Os LOD das FQ reportados foram 5 µg kg⁻¹ para todos os tecidos.

Em 2001, Posyniak et al. avaliaram o efeito do preparo de amostra na determinação EFX, CFX, sarafloxacin e difloxacin em músculo e fígado de frango. Foi avaliado o procedimento de ELL descrito por Posyniak et al. (1999), sendo recomendada a solução de ácido tricloroacético 10 %/ACN (80/20 v/v), digestão enzimática e emprego de ultrassom. Os três procedimentos testados apresentaram

resultados semelhantes. Utilizando a EFS, o cartucho SDB1 apresentou maior eficiência de extração entre os cartuchos testados C₁₈, C₈, NH₂, BSA e SDB1.

Yorke e Froc (2000) utilizaram a CLAE com detecção por fluorescência para determinação de nove quinolonas em músculo de frango. Os analitos foram extraídos utilizando uma solução de pH 9,1 (preparada com tris-hidroximetil-aminometano e ácido clorídrico) e acetonitrila. A separação cromatográfica foi efetuada utilizando uma coluna polimérica, PLRP-S. As FQ foram separadas em três condições cromatográficas diferentes: para separação de EFX, CFX, sarafloxacin e difloxacin a FM utilizada foi H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹/ACN/tetraidrofurano (85/15/0 v/v), com detecção nos comprimentos de excitação e emissão de 450 e 280 nm, respectivamente; para separação de danofloxacin e marbofloxacin a composição da FM foi H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹/ACN/tetraidrofurano (92,5/6/1,5 v/v), com detecção nos comprimentos de excitação e emissão de 514 e 294 nm, respectivamente e para separação de ácido oxolínico, ácido nalidíxico e flumequina a composição da FM foi H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹/ACN/tetraidrofurano (72/16/12 v/v), com detecção nos comprimentos de excitação e emissão de 366 e 312 nm, respectivamente. Os LOQ variaram de 0,5 a 35 µg kg⁻¹.

Roybal et al. (1997) determinaram EFX, CFX, sarafloxacin e difloxacin em leite bovino utilizando a CLAE com detector de fluorescência. A detecção foi efetuada nos comprimentos de excitação e emissão de 450 e 278 nm, respectivamente. O procedimento de preparo da amostra consistiu na extração das FQ do leite com etanol acidificado e isolamento e retenção das FQ utilizando cartucho de troca catiônica (ácido propilsulfônico). A FE utilizada na separação cromatográfica foi uma coluna fenil (Metachem Inertisil) e a FM composta de ACN/ácido acético 2 % (15/85 v/v). O LOQ foi determinado como o menor ponto da curva analítica para todas FQ de 5 µg kg⁻¹.

Strelevitz e Linhares (1996) desenvolveram metodologia analítica utilizando a CLAE com detector de fluorescência para quantificar danofloxacin, N-desmetil-danofloxacin, EFX, CFX, norfloxacin e ofloxacin em bovinos (músculo, fígado, rim e gordura) e em frangos (músculo e fígado). Os analitos foram extraídos usando

uma solução com MeOH/HClO₄ e H₃PO₄ 0,015 mol L⁻¹ (50/50 v/v). Após centrifugação o sobrenadante foi analisado diretamente por cromatografia líquida. Foi empregada como FE uma coluna Inertsil C₈ e FM contendo tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 3,5)/ACN (88/12 v/v). A detecção foi efetuada nos comprimentos de excitação e emissão de 440 e 280 nm, respectivamente. O método foi validado para danofloxacin e N-desmetil-danofloxacin. O LOQ calculado para estas duas FQ foi de 10 µg kg⁻¹.

Horie et al. (1994) determinaram EFX, benofloxacin, danofloxacin e ofloxacin em músculo de frangos utilizando a CLAE/fluorescência, com detecção nos comprimentos de excitação e emissão de 455 e 295 nm, respectivamente. A extração das FQ foi efetuada utilizando ácido metafosfórico 0,2 %/ACN (70/30 v/v) seguida de limpeza do extrato utilizando cartucho C₁₈ (Bond Elut). A separação cromatográfica foi feita empregando uma coluna Wakosil II 5C₁₈ - HG e FM tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,4)/ACN (80/20 v/v) contendo 2,5 mmol L⁻¹ de ácido heptanosulfônico. Os LOD calculados foram de 10 µg kg⁻¹, exceto para benofloxacin a qual foi 20 µg kg⁻¹.

Hormazabal et al. (1991) determinaram EFX e sarafloxacin em músculo e fígado de salmão utilizando a CLAE/fluorescência. Os tecidos foram previamente homogeneizados com ACN e NH₄OH e a gordura retirada por extração com solventes orgânicos (éter dietílico e hexano). Foi utilizada uma FE polimérica, PLRP-S. A FM empregada foi H₃PO₄ 2 mmol L⁻¹/ACN/MeOH (73/19/8 v/v). A detecção foi efetuada nos comprimentos de excitação e emissão de 440 e 278 nm, respectivamente. Os LOQ determinados para os tecidos foram de 5 µg kg⁻¹ para EFX e 10 µg kg⁻¹ para sarafloxacin.

Alguns autores utilizam a LC-fluorescência-MS e LC-MS-MS na determinação de multirresíduos de FQ. Estas técnicas permitem a quantificação com confirmação da identidade dos analitos, com baixos limites de detecção. Schneider e Donoghue (2002) analisaram oito FQ (EFX, CFX, desetil CFX, sarafloxacin, difloxacin, danofloxacin, norfloxacin e orbifloxacin) por CLAE combinando a detecção por fluorescência com a espectrometria de massas múltipla (MSⁿ) para quantificar e

confirmar FQ em músculo e fígado de frangos. O preparo de amostras empregou a ELL com uma série de etapas e injeção cromatográfica do extrato evaporado e redissolvido em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 9. Uma coluna fenil (Zorbax Eclipse XDB) foi empregada como FE na separação das FQ e como FM eluição por gradiente com ácido fórmico 1 % ajustado em pH 3,0 com NaOH e acetonitrila. A detecção foi efetuada nos comprimentos de excitação e emissão de 440 e 278 nm, respectivamente. Os LOD para detecção por fluorescência variaram de 0,2 a 2 µg kg⁻¹ em fígado e de 0,1 a 1,5 µg kg⁻¹ em músculo.

Rose et al. (1998) desenvolveram metodologia para análise de multirresíduos de quinolonas (ácido oxolínico e ácido nalidíxico) e fluoroquinolonas (EFX, CFX, flumequina, danofloxacina, enoxacina, lomefloxacina, marbofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e sarafloxacina) em músculo e fígado de frangos, músculo de perus, de bovinos, de suínos, em mel e ovos. Foi empregada a CLAE com detector de fluorescência para quantificação dos analitos e LC-MS para confirmação de identidade. O preparo de amostra foi dividido em extração dos analitos com caráter ácido e caráter básico empregando para tanto, cartuchos de troca aniônica e troca catiônica, respectivamente. Na separação cromatográfica foi empregada como FE uma coluna Zorbax C₈ e como FM, tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹, ajustado em pH 3,0 com trietilamina/ACN (80/20 v/v). A detecção foi feita nos comprimentos de excitação e emissão de 445 e 278 nm, respectivamente, para todas as FQ, exceto para marbofloxacina que foi monitorada no detector UV em 302 nm. Os LOD variaram de 5 a 50 µg kg⁻¹ para as FQ estudadas.

Van Vyncht et al. (2002), utilizaram a cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massa-massa com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS-MS), que combina alta especificidade, sensibilidade, determinações rápidas e multiresiduais (11 FQ) em matrizes complexas (fígado de suínos). Foi utilizada acetonitrila na extração das FQ do fígado. Após homogeneizar e centrifugar o extrato, o sobrenadante foi coletado, filtrado e acidificado, anterior a separação das FQ por EFS. Vários sistemas de extração foram testados utilizando cartuchos C₁₈, SCX (troca catiônica), BEC (fase mista) e discos de extração SDB-RPS (suporte

polimérico) e MPC-SD (resina mais porosa). Os de fase mista apresentaram resultados tão bons quanto os discos de extração, mas um número maior de interferentes foi detectado pelo LC-MS-MS. Os LOD variam entre 10 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Johnston et al. (2002) desenvolveram e validaram metodologia para determinar oito quinolonas (ácido oxolínico, flumequina, ácido piromídico, EFX, CFX, danofloxacina, sarafloxacina e orbifloxacina) em tecidos de truta, em camarão e em abalone, utilizando a LC-ESI-MS-MS. Os analitos foram extraídos dos tecidos homogeneizados utilizando acetonitrila, e os extratos passaram por um processo automatizado de EFS em dois estágios, com um cartucho polimérico de fase reversa e outro de troca aniônica. Foi empregada como FE na separação das FQ, uma coluna Zorbax Extend C₁₈ (30 °C) e como FM eluição por gradiente com ácido fórmico 2 % e acetonitrila. Os LOD variaram de 1 a 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOQ para CFX foi de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e das outras FQ de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Outras técnicas têm sido empregadas nas determinações da EFX e CFX em tecidos animais e formulações farmacêuticas. Ragab e Amin (2003) determinaram FQ em formulações farmacêuticas utilizando a espectroscopia de absorção atômica, a condutometria e a colorimetria. Chen e Schneider (2003) utilizaram a espectrofluorometria para determinar EFX em músculo de frango. Navalón et al. (2002) e Rizk et al. (2000) utilizaram a voltametria adsortiva de pulso diferencial nas determinações em formulações farmacêuticas. Barrón et al. (2001) utilizaram a eletroforese capilar para determinar resíduos destes fármacos em músculo de frango.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar as propriedades farmacocinéticas da enrofloxacin em frangos, assim como os níveis de resíduos de EFX e CFX em tecidos de frango.

Os objetivos específicos foram:

- (i) Desenvolver e validar um método analítico para determinação de EFX em medicamentos veterinários, bem como EFX e CFX em plasma e tecidos de frangos (fígado, rim e músculo);
- (ii) Avaliar as propriedades farmacocinéticas da EFX e determinar seu metabólito, CFX, em frangos de linhagem utilizada no Brasil, após administração oral do medicamento;
- (iii) Determinar os níveis de resíduos de EFX e CFX em tecidos de frango (fígado, rim e músculo) após administração oral do medicamento, com diferentes períodos de carência até o abate.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

III.1 - Materiais

III.1.1 - Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas empregando:

(i) Um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA) composto de uma bomba de duplo pistão Waters 510; injetor 7725 (Rheodyne, EUA) com amostrador de 20 μ L; detetor UV/VIS 486 (Waters, EUA) e integrador Chrom Jet CH1 série 034/15705-5 (Shimadzu, Japão).

(ii) Um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, EUA), composto por um sistema binário 1525; injetor 7725 (Rheodyne, EUA), com amostradores de 20 μ L e 50 μ L; detetor de arranjo de fotodiodos (DAD) 2996 (Waters, EUA). A aquisição de dados foi realizada mediante interface Millennium³² versão 4.0 e microcomputador Pentium III, 900 MHz, HD 20 G com impressora HP 640C (Hewlett Packard, EUA).

Para pesagem dos padrões analíticos e dos reagentes foi utilizada uma balança eletrônica BL 2105 (Sartorius, Alemanha), com precisão de $\pm 0,0001$ g.

O banho de ultra-som USC 700 (Unique Thorton, Brasil) foi utilizado na degaseificação da fase móvel e no preparo de amostras.

O pH das soluções foi ajustado em um pH-metro OP-271 (Digimed DM-20, Brasil), empregando um eletrodo de vidro combinado.

O homogeneizador Ultra-Turrax, T18 basic (IKA, Brasil) foi utilizado na homogeneização das amostras de tecidos.

Para a separação do plasma, assim como em etapas do preparo de amostras foi utilizada uma centrífuga Excelsius II (Fanem, Brasil).

A extração em fase sólida empregada no preparo de amostras foi realizada utilizando um sistema a vácuo (Alltech, EUA) com capacidade para 12 cartuchos.

III.1.2 - Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas empregadas para a separação das FQ foram:

- ◆ Coluna analítica de fase reversa C₁₈ Lichrocart 125 x 4 mm, 5 µm (Merck, Alemanha), código 50943/1. Coluna de guarda C₁₈ Lichrocart 6,0 x 4,0 mm (Merck, Alemanha).
- ◆ Coluna analítica de fase reversa mista C₁₈/Cátion, Mixed Mode, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Alltech, EUA) código 72575. Coluna de guarda RP₁₈/Cátion 7,5 x 4,6 mm (Alltech, EUA).

III.1.3 - Cartuchos para extração em fase sólida

No preparo das amostras de plasma e tecidos foram empregados os seguintes cartuchos de extração:

- ◆ C₁₈, Bond Elut, 200 mg, 3 mL (Varian, EUA);
- ◆ Fase reversa mista com trocador catiônico, Narc-2, 125 mg, 3 mL (Baker, EUA).

III.1.4 - Solventes e reagentes

A acetonitrila e o metanol utilizados foram solventes de grau cromatográfico (Mallinckrodt, EUA) ou (Baker, EUA).

Os reagentes pares iônicos hidróxido de tetraetilamônio, trietilamina e decanossulfonato de sódio foram Sigma (EUA), dodecilsulfonato de sódio e hidróxido de tetrabutílamônio da Merck (Alemanha) e perclorato de potássio da VETEC (Brasil).

Todos os demais reagentes utilizados no preparo de soluções foram de grau p.a e são citados no item III.2.

III.1.5 - Medicamentos de uso veterinário

As amostras de medicamentos empregadas na validação do método e no ensaio farmacocinético foram soluções de enrofloxacina 10 % m/v, formulação para administração oral, obtidas no comércio.

III.2 - Preparo de soluções

Todas as soluções foram preparadas com água obtida em sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA). As soluções tampão e solventes foram filtrados anterior ao uso, em filtros de membrana apropriados de 0,45 μm , em sistema de filtração (Millipore, EUA).

III.2.1 - Tampão fosfato de sódio

Um litro da solução tampão fosfato de sódio de concentração 0,050 mol L⁻¹ foi preparado a partir da dissolução de 6,9692 g de NaH₂PO₄.H₂O (99 %, Merck, Alemanha) em água. O pH da solução foi ajustado utilizando-se ácido fosfórico (Merck, Alemanha).

III.2.2 - Soluções estoque de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina

As soluções estoque (solução A) de concentração de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ foram preparadas a cada 90 dias a partir da enrofloxacina (99,7 %, Hoechst, Alemanha), ciprofloxacina (98 %, Fluka, EUA) e ofloxacina (98 %, Fluka, EUA), dissolvendo-se separadamente cada padrão analítico em ácido acético 2 % v/v (Merck, Alemanha). As soluções foram estocadas em freezer ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongeladas anterior ao uso para o preparo das soluções de trabalho.

III.2.3 - Soluções de trabalho de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina

As soluções de trabalho de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina, na concentração de $50,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, foram preparadas mensalmente a partir da diluição de 2,50 mL da solução estoque A (III.2.2) para 50 mL (solução B).

III.2.4 - Soluções de ofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina para construção das curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas empregando soluções de concentrações de EFX e CFX no intervalo de $0,0500$ a $10,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, mediante diluição diária da solução de trabalho B (item III.2.3) com volumes apropriados de água. O padrão interno (OFX) foi adicionado a cada solução para uma concentração final de $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da solução de trabalho B.

III.3 - Procedimento Experimental

III.3.1 - Desenvolvimento do método cromatográfico

III.3.1.1 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia líquida por par iônico

Para avaliar a composição da fase móvel na separação das FQ por cromatografia líquida por par iônico (CLPI), foram avaliadas:

- ◆ As percentagens de acetonitrila (ACN) na fase móvel (FM) tampão fosfato de sódio $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ ACN, hidróxido de tetrabutilamônio (HTBA) 5 m mol L^{-1} foram variadas em 10, 12 e 15 % v/v.

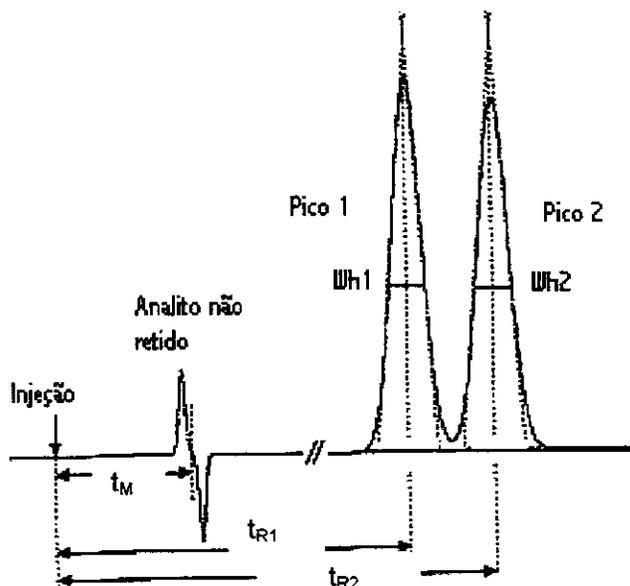
- ◆ A adição de íons de carga positiva: trietilamina, hidróxido de tetraetilamônio e hidróxido de tetrabutilamônio.

- ◆ A adição de íons de carga negativa: decanossulfonato de sódio, dodecilsulfonato de sódio e perclorato de potássio.

- ◆ A concentração de HTBA adicionado à FM tampão fosfato de sódio $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ ACN (90/10 v/v) foi variada em 5, 10, 25 e 50 mmol L^{-1} .

- ◆ O pH do tampão fosfato de sódio da FM, foi variado de 2,0 a 4,0.

Como critério de seleção das condições ótimas, quanto a composição da fase móvel, foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k), fator de separação (α), eficiência (N) e resolução (R_s). Um cromatograma característico e as fórmulas para calcular os parâmetros cromatográficos estão apresentados na Figura 4.



Fator de retenção: $k_1 = (t_{R1} - t_M)/t_M$

Fator de separação: $\alpha = k_2/k_1$

Números de pratos: $N_1 = 5,54 (t_{R1}/w_{h1})^2$

Resolução:

$R_s = 1,177 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})$

Sendo condições ótimas (SHABIR, 2003):

$1 < k < 10; 1,1 < \alpha < 1,4; R_s > 2,0.$

Figura 4 - Parâmetros cromatográficos.

Como fase estacionária foi empregada uma coluna C₁₈ Lichrocart 125 mm x 4 mm, 5 µm (Merck, Alemanha). O detector utilizado foi o de absorvância no UV, e as leituras foram feitas no comprimento de onda de 278 nm (máximo de absorção das duas FQ). Os padrões foram injetados na concentração 1,00 µg mL⁻¹. A eluição foi realizada no modo isocrático com vazão de 1 mL min⁻¹.

III.3.1.2 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia em fase reversa/troca iônica

A FM utilizada com a FE mista, C18-catiônica, Mixed Mode, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm (Alltech, EUA), foi otimizada nas mesmas condições descritas no item III.3.1.1, exceto pela adição do par iônico.

♦ A percentagem de ACN na FM tampão fosfato de sódio 0,050 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN foi variada em 10, 12 e 15 % v/v.

◆ O pH do tampão fosfato de sódio da FM tampão fosfato de sódio $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ /ACN (90/10 v/v) foi variado de 2,0 a 4,0.

◆ Como padrão interno foram avaliadas as seguintes FQ: perfloxacina (PFX); norfloxacina (NFX) e ofloxacina (OFX).

Como FE foi empregada uma coluna C18-catiônica, Mixed Mode, $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (Alltech, EUA). O detector utilizado foi o de arranjo de fotodiodos (DAD) e as leituras foram feitas no comprimento de onda de 278 nm (máximo de absorção das duas FQ). Os padrões foram injetados na concentração $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. A eluição foi realizada no modo isocrático com a vazão de 1 mL min^{-1} .

III.3.1.3 - Condições cromatográficas para a separação de EFX, CFX e OFX

As condições cromatográficas empregadas para a análise de medicamentos, plasma e tecidos de frangos foram: FE uma coluna analítica de fase reversa mista C₁₈/Cátion, Mixed Mode ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); FM tampão fosfato de sódio $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN. A eluição foi realizada por gradiente (0 a 8 min 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v). A vazão foi de 1 mL min^{-1} . A detecção foi realizada com detetor DAD em 278 nm para EFX e CFX e em 294 nm para a OFX sendo feito monitoramento de 200 - 400 nm. A quantificação foi realizada pelo método de padronização interna, empregando para tanto, a OFX.

III.3.1.4 - Estabilidade da EFX e CFX em solução aquosa

A estabilidade da EFX e CFX em solução foi avaliada mediante determinação da concentração da EFX e CFX em função do tempo. Para tanto, uma solução de trabalho (III.2.3) contendo as duas FQ, na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi preparada a partir da solução estoque. A solução foi estocada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante trinta dias, sendo analisada nos dias 1, 15 e 30 após o preparo da mesma.

Ainda, uma solução de EFX e CFX de concentração $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$, estocada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, foi analisada durante 5 dias consecutivos.

Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em triplicata e as condições cromatográficas empregadas estão descritas em III.3.1.3.

III.3.2 - Medicamentos de uso veterinário

III.3.2.1 - Validação do método para determinação de EFX em medicamentos

Para garantir a confiabilidade do método analítico proposto para quantificar EFX em medicamentos de uso veterinário foram avaliados alguns parâmetros tendo como referência as recomendações de SHABIR (2003), que reúne as informações do FDA (*US Food and Drug Administration*), da USP (*US Pharmacopoeia*) e do ICH (*International Conference on Harmonization*), para validação de métodos para análises farmacêuticas utilizando a CLAE. Os parâmetros de validação descritos por SHABIR (2003), os quais estão apresentados a seguir, estão de acordo com aqueles definidos pela Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC) e foram empregados neste trabalho para a validação do método para a determinação de EFX em formulações farmacêuticas.

As condições cromatográficas empregadas foram àquelas descritas em III.3.1.3.

♦ Seletividade: avaliada pelo teste de degradação da EFX em meio ácido, básico e oxidante. Para tanto, uma solução de EFX de concentração $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi (1) submetida à temperatura de 50 a 60 °C, em banho-maria, durante 60 min e, preparada em (2) HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (3) NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (4) H_2O_2 3 % v/v. Todas soluções foram preparadas em duplicata. A concentração final da EFX, após os diferentes tratamentos, e os produtos de degradação formados foram determinados por CLAE.

♦ Faixa linear: foram construídas curvas analíticas (área analito/área padrão interno *versus* concentração de EFX e CFX) no intervalo de concentração de 0,0500 a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

♦ Linearidade (r) e sensibilidade (B): calculadas a partir da regressão linear de cinco curvas analíticas construídas em dias diferentes, da EFX e CFX, nas concentrações de 0,0500 à 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com adição do padrão interno ofloxacina (OFX) na concentração de 0,500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As injeções foram feitas em duplicata, utilizando amostrador de 20 μL .

♦ Limite de detecção (LOD): calculado a partir de cinco curvas analíticas pela seguinte expressão $\text{LOD} = (3 \cdot s_{y/x})/m$, onde $s_{y/x}$ = estimativa do desvio padrão das curvas analíticas e m = coeficiente angular da curva analítica.

♦ Limite de quantificação (LOQ): calculado a partir de cinco curvas analíticas pela seguinte expressão $\text{LOQ} = (10 \cdot s_{y/x})/m$, onde $s_{y/x}$ = estimativa do desvio padrão das curvas analíticas e m = coeficiente angular da curva analítica.

♦ Precisão intra-ensaio: foi avaliada mediante análise consecutiva ($n=5$) em um mesmo dia de uma solução contendo EFX, CFX e OFX na concentração equimolar de 0,500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), obtido pela equação 1:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{estimativa do desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \quad (1)$$

♦ Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise de uma solução contendo 0,500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EFX, CFX e OFX em cinco dias diferentes. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em triplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

♦ Robustez: foi determinada através da análise individual dos parâmetros mais sujeitos a variação, como pH da solução tampão. Para tanto, uma solução de EFX, CFX e OFX na concentração equimolar de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi injetada no cromatógrafo a líquido em triplicata, empregando fase móvel composta de tampão fosfato de sódio 0,050 mol L^{-1} / ACN. O pH da fase móvel avaliado foi 2,1; 2,3; 2,5; 2,7 e 3,0. A eluição foi realizada por gradiente (0 a 8 min 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v). A vazão foi de 1 mL min^{-1} .

♦ Exatidão: foi avaliada mediante teste de recuperação (nível de fortificação de 50 %) na análise de dois medicamentos destinados ao uso veterinário em aves (de

fabricantes diferentes). Foi construída curva analítica para a EFX, utilizando cinco concentrações dos padrões, em triplicata, na faixa de 1,00 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com adição do padrão interno OFX, na concentração de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A fortificação, a um nível de 50 %, foi realizada mediante diluição das amostras para uma concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e acrescidas de alíquotas de soluções padrão de EFX e OFX para uma concentração final de 2,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram analisadas conforme descrito a seguir.

As amostras de medicamentos foram diluídas com água para uma concentração final na ordem de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e adicionadas de OFX na concentração de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 20 μL foram injetadas, em duplicata, no cromatógrafo a líquido. As condições cromatográficas empregadas estão descritas em III.3.1.3.

A quantificação foi realizada mediante curva analítica, empregando o método de padronização interna. A curva analítica (área da EFX/área da OFX *versus* concentração de EFX) para a EFX foi construída empregando cinco concentrações do padrão (1,00; 3,00; 5,00; 7,00 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com adição do padrão interno OFX, na concentração de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

III.3.3 - Desenvolvimento e validação do método para determinação de EFX e CFX em plasma de frango

III.3.3.1 - Preparo de amostra de plasma

Foram testados diferentes solventes de extração dos analitos da matriz: tampão fosfato, pH 7,0 (DELEPINE et al. 1998); HCl 1 mol L^{-1} (van VYNCHT et al. 2002); ácido acético + ACN (5 + 95 v/v) (ROSE et al. 1998) e ácido tricloroacético (ATCA) 10% + ACN (80 + 20 v/v) (POSYNIK et al. 2001).

Para selecionar uma fase, para o cartucho de extração em fase sólida, adequada para efetuar a separação das FQ do plasma, os padrões analíticos EFX e CFX foram adicionados ao plasma obtido das aves do grupo controle (III.3.7.1,

pág.52) e aplicados aos cartuchos de EFS. Foram avaliados dois tipos de fases: fase reversa C₁₈ Bond Elut, 200 mg, 3 mL (procedimento A) e fase reversa mista com trocador iônico Narc-2, 125 mg, 3 mL (procedimento B). Para tanto, foi empregado um sistema a vácuo com capacidade para 12 cartuchos (Figura 5).

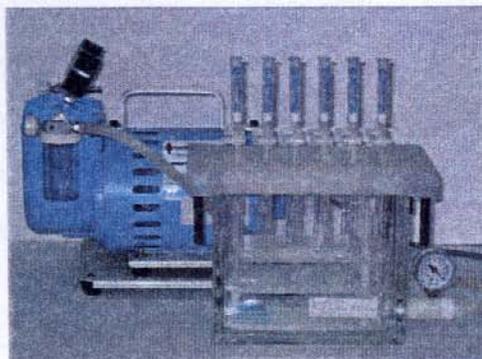


Figura 5 - Sistema a vácuo empregado para a EFS.

Os procedimentos A e B foram baseados nos trabalhos de POSYNIK et al. (2001) e van VYNCHT et al. (2002), respectivamente, com algumas modificações. As condições experimentais das etapas de condicionamento, lavagem, eluição e concentração estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Procedimentos experimentais empregados na EFS.

Cartucho	Condicionamento	Lavagem	Eluição	Concentração
Proc. A C ₁₈	3 mL MeOH 3 mL H ₂ O	3 mL H ₂ O	5 mL tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 2,5)/ ACN (1:1 v/v)	
Proc. B Narc-2	3 mL de ACN/ Acético (95:5 v/v)	3 mL H ₂ O 3 mL MeOH	5 mL NH ₄ OH 1 mol L ⁻¹ / MeOH (25:75 v/v)	Evaporação do solvente c/ N ₂ e redissolução do resíduo em 0,5 mL de FM

III.3.3.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma de frango

Para a validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, tendo como base as recomendações da Comunidade Europeia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC).

Para avaliação dos parâmetros de validação, o preparo de amostra seguiu o fluxograma apresentado na Figura 6 (item III.3.3.3) e as condições cromatográficas foram aquelas descritas em III.3.1.3.

- ◆ Seletividade: foi avaliada pela análise, em triplicata, de amostras de plasma do grupo controle (branco).

- ◆ Faixa linear: foi construída a curva analítica (área EFX e CFX/área OFX *versus* concentração de EFX e CFX) fortificando amostras de plasma em duplicata obtidas de aves do grupo controle, nas concentrações de EFX e CFX de 0,250; 0,500; 1,00; 2,00; 3,00 e 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata, utilizando amostrador de 20 μL .

- ◆ Linearidade e sensibilidade: calculadas a partir da regressão linear da curva analítica para EFX e CFX, obtida anteriormente. A linearidade é expressa pelo coeficiente de regressão linear e a sensibilidade pelo coeficiente angular da curva analítica.

- ◆ Limite de detecção (LOD) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 3, em amostras de plasma do grupo controle nos respectivos tempos de retenção da EFX e CFX.

- ◆ Limite de quantificação (LOQ) foi determinado pela razão sinal/ruído igual a 10, em amostras de plasma do grupo controle. O LOQ foi confirmado mediante análise de amostra de plasma do grupo controle fortificada com o nível de concentração estabelecido.

◆ Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise de quatro amostras de plasma fortificadas com quatro concentrações de EFX e CFX (0,500; 1,00; 2,00 e 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em dias diferentes. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

◆ Exatidão: foi avaliada mediante teste de recuperação (nível de fortificação em 3 níveis). Para tanto, em 500 μL de amostras de plasma foram adicionados 50 μL , 100 μL e 200 μL de uma solução contendo EFX e CFX na concentração de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ainda, foi adicionado 100 μL de uma solução de 5,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OFX para cada nível de fortificação avaliado.

III.3.3.3 - Análise de amostras de plasma

A análise de amostras de plasma segue o fluxograma apresentado na Figura 6. O plasma foi obtido a partir do sangue de aves do grupo controle, mediante centrifugação do mesmo imediatamente após a coleta em tubos heparinizados (Vacuette, 4 mL).

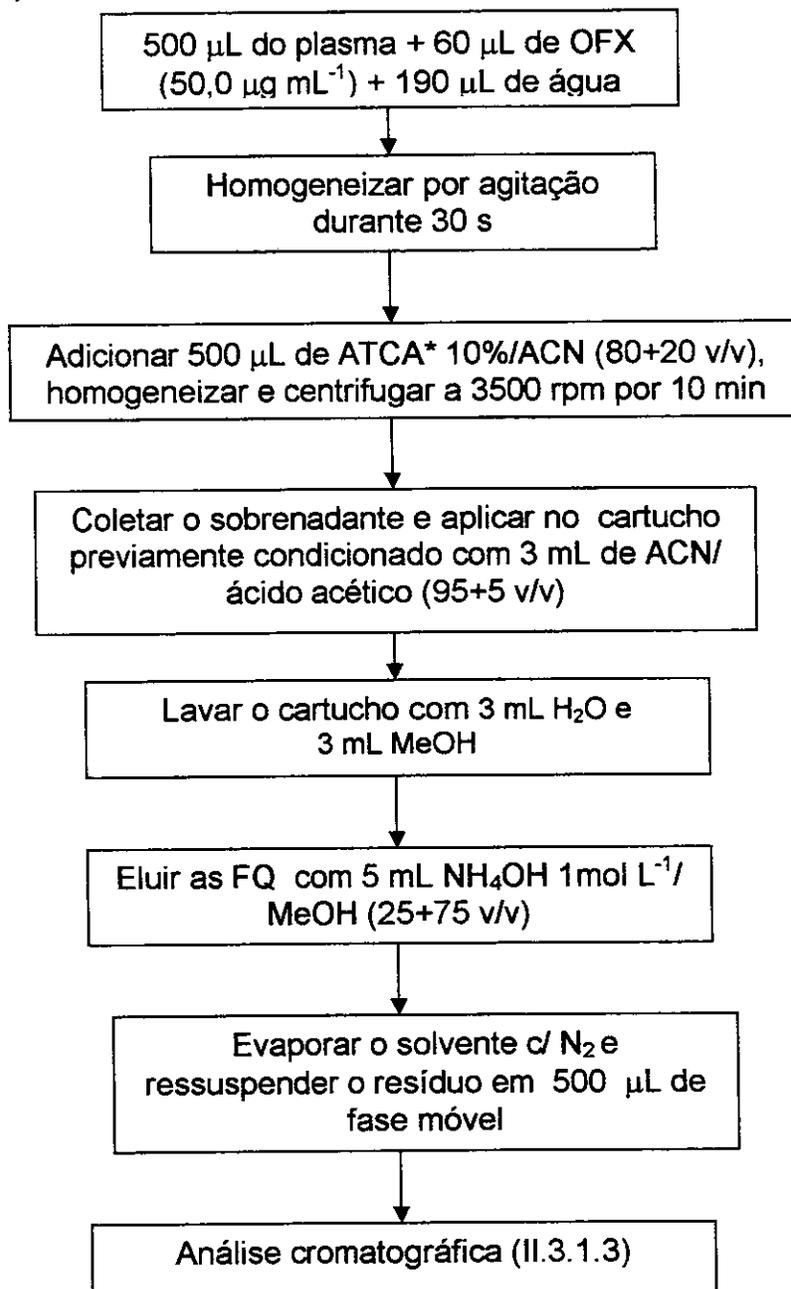


Figura 6 - Procedimento de extração das FQ do plasma. *Ácido tricloroacético.

III.3.4 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango

III.3.4.1 - Preparo de amostra de músculo

Para homogeneizar 1,0 g de amostra em 10 mL do solvente de extração ATCA 10 %/ACN (80/20 v/v) foi utilizado o homogeneizador da Figura 7 e a EFS foi efetuada conforme procedimento B do item III.3.3.1.



Figura 7 - Homogeneizador Ultra -Turrax.

III.3.4.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango

Para a validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, tendo como base as recomendações da Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC).

Para avaliação dos parâmetros de validação, a análise de amostra seguiu o fluxograma apresentado na Figura 6 (item III.3.3.3), sendo utilizado 1,0 g de amostra e 10 mL de solvente de extração.

♦ Seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) foram avaliados conforme descrito no item III.3.3.2.

♦ Faixa linear: foram construídas curvas analíticas (área EFX e CFX/área OFX *versus* concentração de EFX e CFX), fortificando amostras de músculo, obtidas de aves do grupo controle, nas concentrações de EFX e CFX de 0,200; 0,500; 1,00; 2,00 e 6,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata, utilizando amostrador de 50 μL .

♦ Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise de quatro amostras de músculo fortificadas com quatro concentrações de EFX e CFX (25; 50; 100 e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em dias diferentes. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

♦ Exatidão: foi avaliada mediante teste de recuperação (fortificação em 3 níveis). Para tanto em 1,0 g de músculo de aves do grupo controle foram adicionados 500 μL , 1000 μL e 3000 μL de uma solução contendo EFX e CFX na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ainda, foi adicionado 1000 μL de uma solução de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OFX para cada nível de fortificação avaliado.

III.3.5 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango

III.3.5.1 - Preparo de amostra de fígado

O preparo de 1,0 g de amostra foi feito utilizando 10 mL do solvente de extração ATCA 10 %/ACN (80/20 v/v) e a EFS foi efetuada conforme procedimento B do item III.3.3.1.

III.3.5.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango

Para a validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, tendo como base as recomendações Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC).

Para avaliação dos parâmetros de validação o preparo de amostra seguiu o fluxograma apresentado na Figura 6 (item III.3.3.3) utilizando 1,0 g de amostra e 10 mL do solvente de extração. Não foi utilizado padrão interno.

◆ Seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) foram avaliados conforme descrito em III.3.3.2.

◆ Faixa linear: foi construída curva analítica em duplicata (área de EFX e CFX *versus* concentração de EFX e CFX), fortificando amostras de fígado, obtidas de aves do grupo controle, nas concentrações de EFX e CFX de 0,400; 1,00; 2,00; 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata, utilizando amostrador de 50 μL .

◆ Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise de três amostras de fígado fortificadas com três concentrações de EFX e CFX (50, 100 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em dias diferentes. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

◆ Exatidão: foi avaliada mediante teste de recuperação (nível de fortificação em 3 níveis). Para tanto em 1,0 g de fígado de aves do grupo controle foram adicionados de 500 μL , 1000 μL e 2000 μL de uma solução contendo EFX e CFX na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

III.3.6 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango

III.3.6.1 - Preparo de amostra de rim

O preparo de 1,0 g de amostra foi feito utilizando 10 mL do solvente de extração ATCA 10 %/ACN (80/20 v/v) e a EFS conforme procedimento B do item III.3.3.1.

III.3.6.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango

Para a validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, tendo como base as recomendações Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC).

Para avaliação dos parâmetros de validação o preparo de amostra seguiu o fluxograma apresentado na Figura 6 (item III.3.3.3) utilizando 1,0 g de amostra e 10 mL do solvente de extração. Não foi utilizado padrão interno.

◆ Seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) foram avaliados seguindo item III.3.3.2.

◆ Faixa linear: foi construída curva analítica em duplicata (área de EFX e CFX *versus* concentração de EFX e CFX), fortificando amostras de rim, obtidas de aves do grupo controle, nas concentrações de EFX e CFX de 0,200; 0,500; 1,00; 2,00; 6,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata.

◆ Precisão inter-ensaio: foi avaliada mediante análise de três amostras de rim fortificadas com três concentrações de EFX e CFX (500, 1000 e 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em dias diferentes. Todas as injeções no cromatógrafo a líquido foram realizadas em duplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

♦ Exatidão: foi avaliada mediante teste de recuperação (nível de fortificação em 3 níveis). Para tanto em 1,0 g de rim de aves do grupo controle foram adicionados de 500 μL , 1000 μL e 3000 μL de uma solução contendo EFX e CFX na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

III.3.7 - Ensaio com frangos de corte

Os ensaios com as aves transcorreram no período de 29/01/2003 à 12/03/2003. Foram feitas tanto a coleta de amostras para o estudo farmacocinético, como a coleta de amostras para determinação do nível de resíduos presentes nos tecidos. As aves foram criadas no aviário do Laboratório de Nutrição de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Campus de Botucatu.

Foram utilizados 120 pintos de corte, machos, da linhagem Cobb (Figura 8), com 1 dia de idade, vacinados no incubatório contra as doenças de Gumboro, Marek e Bouda aviária. Os pintos foram alojados em 4 boxes de 2,5 m^2 cada, com 30 aves/box, em uma densidade de 12 aves/ m^2 , localizados numa extremidade do aviário experimental tipo convencional.

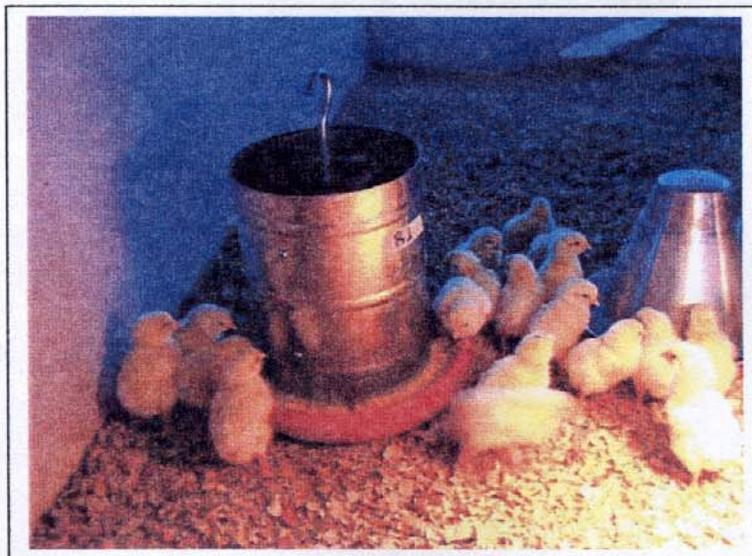


Figura 8 - Aves da linhagem *Cobb*, com 1 dia de vida.

O fornecimento de água e ração inicial foi efetuado por bebedouro e comedouro tipo copo de pressão, um para cada boxe. Estes recipientes foram substituídos gradativamente por bebedouro pendular e comedouro tubular definitivos, também um para cada boxe. A temperatura e a ventilação foram controladas manualmente, manejando-se as cortinas laterais do galpão. Para permitir 24 horas de iluminação, o programa de luz foi feito por suplementação de luz artificial.

As rações foram balanceadas a base de milho, farelo de soja, fosfato bicálcico, calcário calcítico, sal comum, DL-metionina, L-lisina e suplementos vitamínicos e minerais (Tabela 3). O programa de arraçamento foi dividido em quatro fases: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias de idade), conforme recomendações de Rostagno et al. (2000).

Tabela 3 - Composição percentual e valores calculados das rações.

	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Final
Composição (%)				
Milho	56,70	59,40	62,11	66,00
Farelo de soja	36,90	34,15	31,05	27,76
Fosfato bicálcico	1,90	1,78	1,65	1,44
Calcário	1,00	0,97	0,93	0,94
Sal comum	0,45	0,43	0,40	0,38
L- lisina	0,19	0,18	0,18	0,19
DL-metionina	0,18	0,17	0,15	0,14
Óleo de soja	2,15	2,40	3,00	2,65
Suplemento vitamínico*	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento mineral**	0,05	0,05	0,05	0,05
Cloreto de colina	0,05	0,05	0,05	0,05
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,95	3,00	3,08	3,10
Proteína bruta (%)	21,92	20,88	19,69	18,53
Cálcio (%)	0,99	0,94	0,88	0,83
Fósforo disponível (%)	0,47	0,44	0,41	0,37
Fibra bruta (%)	3,41	3,30	3,17	3,04
Metionina (%)	0,51	0,49	0,46	0,43
Lisina (%)	1,31	1,24	1,16	1,09
Aminoácidos sulfurados (%)	0,86	0,82	0,77	0,74

*Vaccinar Nutrição e Saúde Animal. Suplemento vitamínico (por kg de produto):

Pré-Inicial e Inicial - vitamina A, 14.000.000 UI; vitamina D3, 2.500.000 UI; vitamina E, 25.000 mg; vitamina K, 3.000 mg; vitamina B₁, 2.000 mg; vitamina B₂, 5.000 mg; vitamina B₆, 4.000 mg; vitamina B₁₂, 25.000 mcg; niacina, 35.000 mg; ácido pantotênico, 12.000 mg; biotina, 100 mg; ac. fólico, 1.000 mg; vitamina C, 50.000 mg; BHT, 125 mg.

Crescimento - vitamina A, 10.000.000 UI; vitamina D3, 2.000.000 UI; vitamina E, 20.000 mg; vitamina K, 2.000 mg; vitamina B₁, 2.000 mg; vitamina B₂, 4.000 mg; vitamina B₆, 4.000 mg; vitamina B₁₂, 20.000 mcg; niacina, 30.000 mg; ácido pantotênico, 10.000 mg; biotina, 60 mg; ac. fólico, 1.000 mg; vitamina C, 50.000 mg; BHT, 125 mg.

Final - vitamina A, 8.000.000 UI; vitamina D3, 1.500.000 UI; vitamina E, 1.500 mg; vitamina K, 2.000 mg; vitamina B₁, 1.000 mg; vitamina B₂, 3.000 mg; vitamina B₆, 2.000 mg; vitamina B₁₂, 15.000 mcg; niacina, 20.000 mg; ácido pantotênico, 8.000 mg; biotina, 40 mg; ácido fólico, 500 mg; vitamina C, 50.000 mg; BHT, 125 mg. ** Vaccinar Nutrição e Saúde Animal. Suplemento mineral (por kg de produto): selênio, 360 mg; iodo, 1400 mg; ferro, 96.000 mg; cobre, 20.000 mg; manganês, 156.000 mg; zinco, 110.000 mg.

No 32º dia de confinamento, as aves foram alocadas em gaiolas experimentais numa sala de temperatura e umidade controlada (Figura 9).

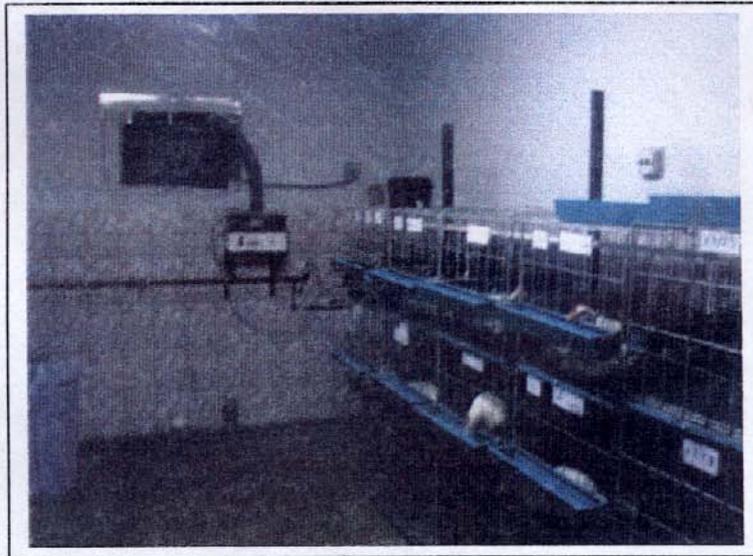


Figura 9 - Gaiolas em sala com controle de temperatura e umidade.

As aves foram pesadas na ocasião da transferência para as gaiolas, e foram separadas em cinco grupos, os quais estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Peso médio das aves dos grupos controle, farmacocinético e nível de resíduos.

Grupo	n	Peso (g) 32º dia (média ± s)	Volume de medicamento* aplicado (mL)	Peso (g) de abate (média ± s)
Controle	19	1.860 ± 86	-	2.411 ± 114
Farmacocinético	8	1.805 ± 43	0,220	2.360 ± 102
Resíduos (I)	8	1.823 ± 56	0,170	2.463 ± 152
Resíduos (II)	8	1.972 ± 89	0,180	2.430 ± 149
Resíduos (III)	8	2.022 ± 145	**	2.275 ± 146

n: número de aves; s = estimativa do desvio padrão; (*) solução oral de EFX 110 mg mL⁻¹; (**) o volume foi calculado para cada ave.

No 42º dia, as aves (Figura 10) foram abatidas e as amostras de tecidos de músculo, fígado e rim coletados.

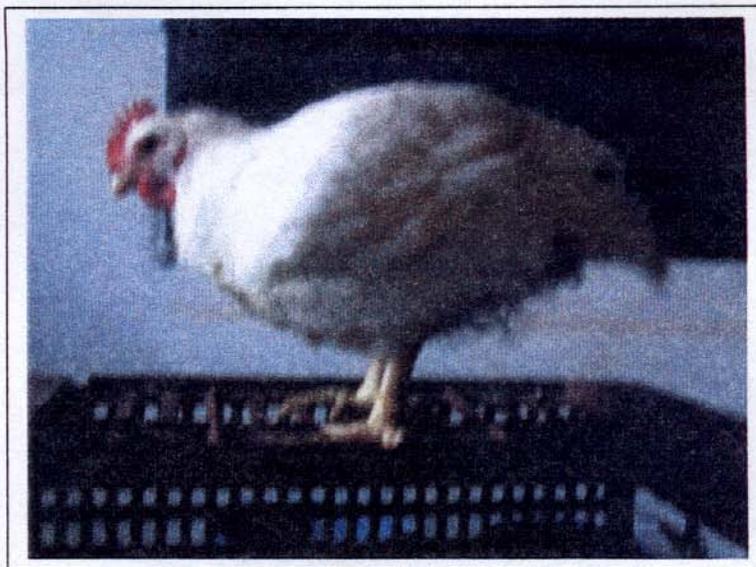


Figura 10 - Ave da linhagem *Cobb*, com 42 dias de vida.

Ração e água foram oferecidos aos animais *ad libitum*, até a aplicação do medicamento. Os animais ficaram em jejum de 12 horas antes, até 6 horas após a administração oral do medicamento. Utilizou-se micropipeta variável de 100 a 1000 μL para administração do medicamento, diretamente no esôfago da ave.

Foi considerado o peso médio do grupo para calcular a dose a ser aplicada a cada animal quando o desvio padrão relativo da média do peso do grupo foi inferior a 5 %. Somente para o grupo de resíduos III o medicamento foi aplicado pelo peso individual de cada ave, tendo em vista que houve uma variação maior que 5 % em relação ao RSD da média do peso corpóreo.

A dose aplicada às aves, tanto do ensaio farmacocinético como do nível de resíduos, foi calculada a partir da seguinte expressão:

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{Dose recomendada (mg/1000 g)} * \text{Peso ave (g)}}{\text{Concentração do medicamento (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad (2)$$

A concentração de EFX no medicamento administrado às aves foi determinada previamente por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme procedimento descrito em III.3.2.1. O medicamento apresentou uma concentração de EFX de 110 mg mL^{-1} e a dose administrada foi de 10 mg/kg de p.c. Considerando essa concentração de EFX no medicamento, o volume administrado a cada ave foi calculado pela seguinte expressão:

$$\text{Volume (mL)} = (9,091 \cdot 10^{-5}) * \text{Peso médio grupo/ave (g)} \quad (3)$$

III.3.7.1 - Ensaio farmacocinético com frangos de corte

O animais destinados ao ensaio farmacocinético foram divididos em dois grupos e o cronograma do ensaio é apresentado na Tabela 5.

Grupo Controle

Este grupo de frangos (8 aves) não recebeu medicamento.

Grupo destinado para o estudo farmacocinético

Todos os frangos (8 aves) receberam, via oral, diretamente no esôfago, dose única de 10 mg/kg de p.c. no 40º dia de vida. As amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca nos tempos de 0; 0,25; 0,5; 1; 2 horas e via punção na veia braquial das asas a partir dos tempos, 4; 6; 8; 12; 24 e 48 horas após administração da EFX, totalizando 11 coletas.

Tabela 5 - Cronograma empregado para realização do ensaio farmacocinético com as aves.

Grupos	DIAS DE VIDA									
	33º	34º	35º	36º	37º	38º	39º	40º	41º	42º
Controle (8 aves)									(s)	
Farmacocinético (8 aves)								OR (s)	(s)	(s)

OR: administração oral de enrofloxacina; (s): coleta de sangue.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e imediatamente centrifugadas para a separação do plasma (Figura 11). O plasma foi transferido para tubos eppendorf de 2 mL de capacidade (0,5 mL/tubo), transportado em caixa de isopor com gelo e estocado em menos de 12 horas, à -18°C , onde permaneceu até análise.

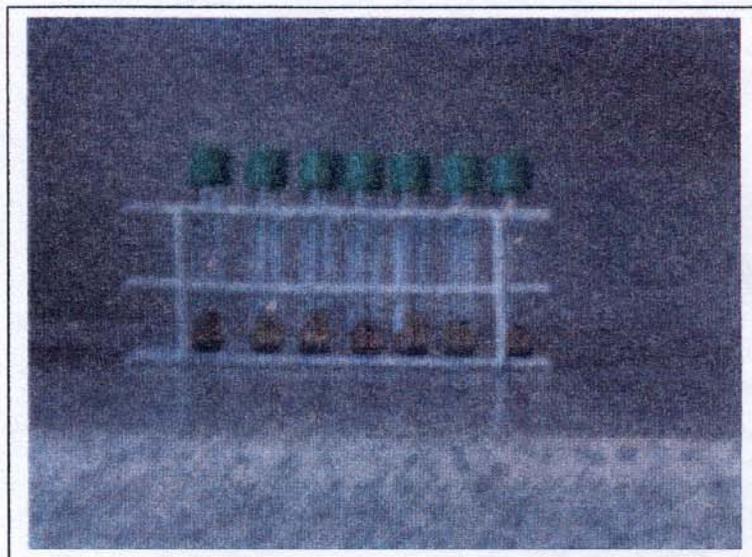


Figura 11 - Obtenção do plasma das amostras de sangue coletadas.

As concentrações de EFX foram determinadas conforme descrito no item III.3.3.1. Após a análise das amostras de plasma das aves o perfil farmacocinético da EFX foi construído, plotando-se a concentração de EFX de cada uma das 11 amostras de plasma *versus* tempo, para cada animal. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados a partir do gráfico gerado.

A área sobre a curva ($ASC_{0 \rightarrow t}$) da concentração plasmática *versus* o período de tempo estudado foi calculada usando a régua trapezoidal para todos os pontos da curva (ANADÓN et al., 1995; KNOLL et al., 1999).

O tempo médio de residência (TMR) da EFX foi calculado pela equação sugerida por Anadón et al. (1995):

$$\text{TMR} = (A_1/\kappa^2 + A_2/\alpha^2 + A_3/\beta^2) \times 1/\text{AUC} \quad (4)$$

Foi construído um gráfico do log das concentrações plasmáticas *versus* tempo para cada animal. A constante de eliminação K_e foi calculada Utilizando a regressão linear da fase de eliminação, seguindo recomendações de Kalant e Roschlau (1991), onde $K_e = m \cdot 2,303$, onde m = coeficiente angular da curva.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado de acordo com a equação utilizada por Knoll et al. (1999).

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_e \quad (5)$$

III.3.7.2 - Ensaio para a determinação de níveis de resíduos em músculo, fígado e rim

O animais destinados ao ensaio para quantificar os níveis de resíduos de EFX e CFX foram divididos em dois grupos e o cronograma do ensaio é apresentado na Tabela 6.

Grupo controle

Este grupo de animais (8 aves) não recebeu medicamento. Todas as aves foram sacrificadas no 42^o dia de vida, mediante desarticulação cervical.

Grupo destinado para o estudo de níveis de resíduos de EFX e CFX

Oito frangos de cada vez, receberam, via oral, 10 mg/kg de p.c., por 3 dias consecutivos após o 33^o (grupo I), 35^o (grupo II) e 37^o (grupo III) dia de vida. As aves dos grupos I, II e III (8 por vez) foram sacrificadas nos 7^o, 5^o e 3^o dias, respectivamente, por desarticulação cervical, após a última administração de EFX, conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6 - Cronograma empregado para realização do ensaio com níveis de resíduos com as aves.

Grupos	DIAS DE VIDA										
	33°	34°	35°	36°	37°	38°	39°	40°	41°	42°	
Controle (8 aves)											ABATE (t)
Resíduos (I) (8 aves)	OR	OR	OR								ABATE (t)
Resíduos (II) (8 aves)			OR	OR	OR						ABATE (t)
Resíduos (III) (8 aves)					OR	OR	OR				ABATE (t)

OR: administração oral de enrofloxacina; (t): coleta de tecidos de músculo (peito), fígado, rim.

Após o abate foram coletados tecidos (Figura 12) de oito animais de cada grupo, para estudo do nível de resíduos.

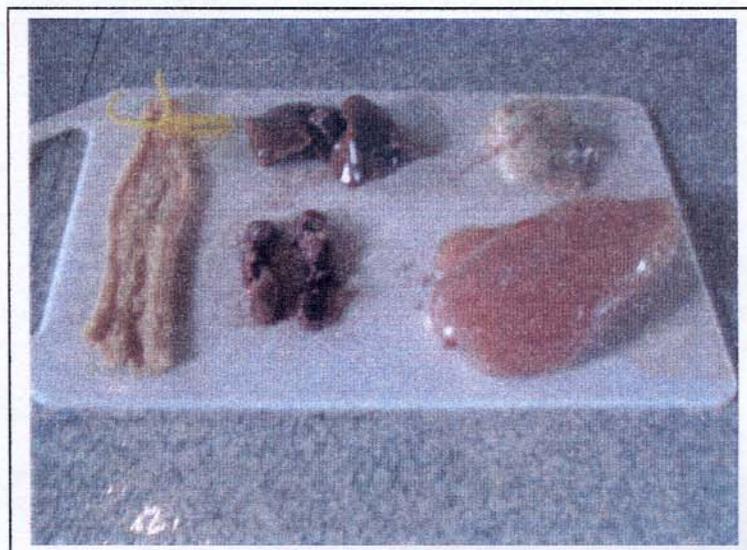


Figura 12 - Tecidos coletados das aves.

As análises de músculo, fígado e rim foram realizadas conforme procedimentos analíticos descritos nos itens III.3.4, III.3.5 e III.3.6, respectivamente.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 - Desenvolvimento do método cromatográfico

A enrofloxacin (EFX) e a ciprofloxacina (CFX) possuem caráter anfótero, com valores de pK_{a1} entre 5,5 e 6,0 e pK_{a2} entre 7,7 e 8,5 (BARBOSA et al., 2001). Em pH neutro ($\sim 7,0$) as moléculas podem estar nas formas zwitteriônica, neutra e em pequena quantidade na forma protonada. O equilíbrio de ionização para EFX é apresentado na Figura 13 e é válido para outras FQ com grupos piperazinila em sua estrutura (TURIEL et al., 2003).

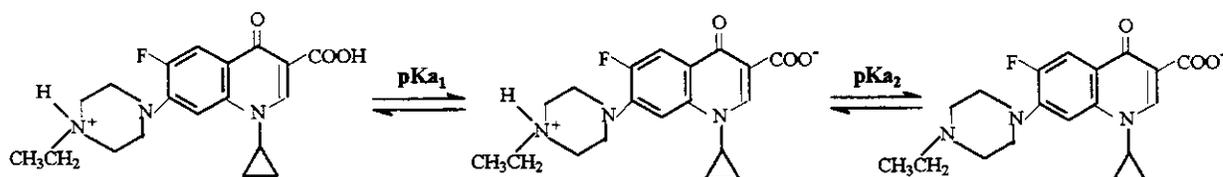


Figura 13 - Estruturas e equilíbrio de ionização da EFX.

A supressão iônica é recomendada em separações cromatográficas de compostos ácidos ou bases fracas, quando se emprega uma FE apolar (fase reversa) e o mecanismo de partição predomina. Pode-se suprir a ionização de um ácido ou a protonação de uma base, pelo ajuste do pH da FM. Como as moléculas de EFX e de CFX possuem dois valores de pK_a , não é possível por simples ajuste de pH, manter as moléculas na forma não ionizada. Em meio ácido a molécula assume uma carga positiva, porque o grupo carboxila fica não ionizado e o nitrogênio do grupo piperazinila protonado. Em meio básico, a molécula apresenta carga negativa, devido ao grupo carboxilato ficar desprotonado.

A cromatografia em fase reversa empregando uma coluna octadecil, onde prevalece um mecanismo de partição, não oferece resultados adequados em FM em pH < 4,0 e em pH 7,0, quanto aos parâmetros cromatográficos na separação de EFX e CFX. Em todos os valores de pH estudados os picos obtidos eram largos e assimétricos, afetando diretamente a resolução e eficiência de separação. Por esta razão, dois procedimentos foram avaliados:

- (i) cromatografia líquida por par iônico (utilizando uma coluna octadecil e reagente par iônico adicionado à FM);
- (ii) coluna de fase reversa mista, octadecil com trocador catiônico.

IV.1.1 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia líquida por par iônico

O uso da supressão iônica combinada com o uso de um reagente par iônico (PI) adicionado à FM torna possível a separação da EFX e da CFX empregando uma coluna de fase reversa octadecil. O par iônico tem a finalidade de neutralizar a carga do analito, que restou após a supressão iônica de um dos grupos ionizáveis. Este tipo de cromatografia é denominado cromatografia líquida por pares de íons (CLPI).

Diversos autores relatam na literatura o uso da CLPI na separação de FQ, entre eles: Garcia et al. (2001); Maraschiello et al. (2001); Hernandez-Arteseros et al. (2000); Posyniak et al. (1999); Rose et al. (1998); Gorla et al. (1997); Horie et al. (1994); Tyczkowaska et al. (1994); Hormazábal et al. (1991); Tarbin et al. (1992) e Nangia et al. (1990). Os reagentes PI mais utilizados foram a trietilamina, o ácido heptanosulfônico e o brometo de tetrabutilamônio.

Inicialmente o presente estudo foi realizado com a adição de um reagente de carga positiva (trietilamina, hidróxido de tetraetilamônio e hidróxido de tetrabutilamônio) à FM, cuja fase aquosa foi ajustada em pH ácido. A composição da FM foi otimizada e os resultados são descritos a seguir.

Entre os íons de carga positiva avaliados, o hidróxido de tetrabutilamônio (HTBA) foi o que permitiu além de uma melhor separação entre a EFX e CFX, maior

simetria dos picos. Um cromatograma, utilizando o HTBA, na fase móvel é apresentado na Figura 14.

Ao adicionar os íons de carga negativa decanossulfonato de sódio, dodecilsulfonato de sódio ou perclorato de potássio nas concentrações de 10 mmol L⁻¹ à FM composta de tampão fosfato de sódio (pH 2,5)/ACN (85/15 v/v), não houve eluição dos analitos até 40 min.

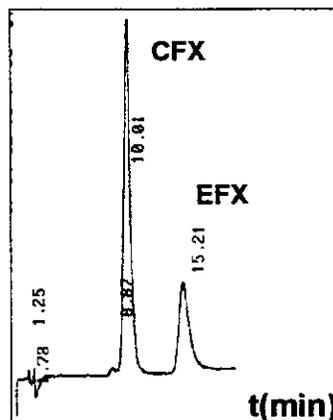


Figura 14 - Cromatograma de separação da EFX e CFX, 1,00 µg mL⁻¹. Fase móvel: Tampão fosfato de sódio, pH 2,5/ACN (90/10 v/v), HTBA 5 mmol L⁻¹. Vazão 1 mL min⁻¹. Fase estacionária C₁₈ Lichrocart.

Mantendo-se constante a concentração do par iônico HTBA em 5 mmol L⁻¹ e variando-se a percentagem de ACN (10, 12 e 15 % v/v) na FM composta de tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN, verificou-se que 10 % v/v de ACN é a quantidade mais adequada de solvente na separação da EFX e CFX. Nesta condição há maior eficiência de separação (N) e maior resolução (Rs) para EFX e CFX (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da composição da fase aquosa/orgânica da FM sobre os parâmetros cromatográficos.

Fase móvel (% v/v)		Parâmetros Cromatográficos				
Tampão fosfato*	ACN	k_1/k_2	α	R_s	$N_1/N_2 (m^{-1})$	$t_{R1}/t_{R2} (min)$
85	15	2,20/3,34	1,52	1,58	5704/2616	3,97/5,38
88	12	2,46/3,75	1,52	2,35	5096/9608	4,29/5,89
90	10	7,01/11,23	1,60	5,10	6664/6374	9,93/15,2

* Tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 2,5. Sendo 1 = CFX e 2 = EFX.

Quanto menor a concentração do par iônico HTBA adicionado à FM (tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ ACN (90/10 v/v) maiores os valores de R_s e de N calculados (Tabela 8). Na concentração de 5 mmol L⁻¹, a repetibilidade entre análises consecutivas ficou comprometida. Avaliando-se em conjunto os parâmetros k , α , N e R_s , a concentração de 10 mmol L⁻¹ do par de carga positiva HTBA foi escolhida como concentração de trabalho.

Tabela 8 - Efeito da variação da concentração do par iônico adicionado a fase móvel, sobre os parâmetros cromatográficos na separação de EFX e CFX.

HTBA	k_1/k_2	α	R_s	$N_1/N_2 (m^{-1})$	$t_{R1}/t_{R2} (min)$
5 mmol L ⁻¹	7,20/11,61	1,61	4,12	29664/7920	10,1/15,5
10 mmol L ⁻¹	5,63/8,73	1,55	3,94	20512/11040	7,96/11,7
25 mmol L ⁻¹	4,83/7,09	1,47	2,35	10432/5160	5,83/8,09
50 mmol L ⁻¹	4,02/5,90	1,47	1,96	8088/3760	5,27/7,24

Sendo 1 = CFX e 2 = EFX.

Utilizando-se a FM tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹/ACN (90/10 v/v), 10 mmol L⁻¹ HTBA, foi variado o pH do tampão fosfato de sódio, no intervalo de 2,0 a 4,0. Em pH 4,0 foi verificado que os analitos não eluíram até um tempo de 40 min, indicando uma grande afinidade da EFX e CFX pela fase estacionária. Apesar de em

pH 2,0 e 2,5 o κ , o R_s e o N serem próximos (Tabela 9), optou-se por trabalhar em pH 2,5, visto que em pH 2,0 se estaria trabalhando no limite mínimo da faixa de pH recomendada para a coluna cromatográfica em questão.

Tabela 9 - Efeito do pH sobre os parâmetros cromatográficos na separação de EFX e CFX.

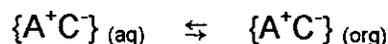
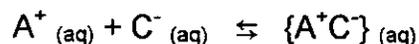
pH	k_1/k_2	α	R_s	$N_1/N_2 (m^{-1})$	$t_{R1}/t_{R2} (min)$
2,0	5,79/8,86	1,53	3,92	22120/11344	8,49/12,3
2,5	5,63/8,73	1,55	3,94	20512/11040	7,96/11,7
3,0	3,29/5,52	1,68	2,64	13056/3400	7,38/11,2
3,5	4,07/8,90	2,18	3,99	20048/3088	8,72/17,0

Sendo 1 = CFX e 2 = EFX.

Os resultados obtidos evidenciam que a separação das FQ na coluna octadecil é favorecida em pH ácido, quando o analito se encontra na forma catiônica e um PI de carga positiva é adicionado à FM. Na literatura três modelos são discutidos (HORVÁTH, 1980; MEYER, 1996 e SNYDER e KIRKLAND 1979) para explicar a separação de analitos por CLPI, os quais propõe a adição de um PI de carga oposta a do analito à fase móvel, como segue:

(i) Modelo da formação do PI

Ao adicionar-se um reagente par iônico (C^-) de carga oposta a do analito (A^+) à FM, forma-se um par iônico (AC), neutro, solúvel na fase orgânica.

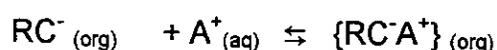


Neste caso o PI tem uma maior afinidade pela fase estacionária apolar e, portanto, o PI apresenta um t_R maior que o analito iônico.

(ii) Modelo da troca iônica

Reagentes par iônico (C^-) são adsorvidos sobre a superfície apolar da FE (R), com um grupo ionizado orientado na direção do meio aquoso, atuando como um trocador iônico dinâmico. O analito (A^+) é então atraído por forças eletrostáticas para o grupo ionizado na superfície da FE.

Neste caso ocorre um aumento do t_R do analito, quando se aumenta a concentração do reagente par iônico.



(iii) Modelo da dupla camada elétrica (BIDLINGMEYER et al., 1979)

De acordo com esse modelo ocorre um equilíbrio dinâmico entre o íon lipofílico na dupla camada elétrica formada na superfície do sorvente. A retenção do analito é causada pela carga da dupla camada formada pelos íons do reagente PI. Os íons do analito competem para o acesso da camada externa com carga, pela qual o mesmo é atraído por forças eletrostáticas e de van der Waals para a camada interna de carga oposta. Também pode ocorrer atração do analito dos sítios apolares da fase estacionária. A dupla camada formada apresenta um potencial de superfície, o qual influencia a retenção do soluto.

Foi verificado que a adição do íon de carga positiva à fase móvel em pH ácido diminui o t_R da EFX e CFX na cromatografia em fase reversa. O mecanismo que melhor explicaria esse fenômeno é o do modelo da dupla camada elétrica proposto por Bidlingmeyer et al. (1979), que sugere interações eletrostáticas como de van der Waals. Pelo seu grupo apolar, o PI forma uma dupla camada em equilíbrio dinâmico com a FM, que provavelmente, por forças eletrostáticas de repulsão, permitem que as moléculas do analito sejam eluídas em um tempo de retenção menor e com maior resolução, do que quando o PI não é utilizado (Figura 15).

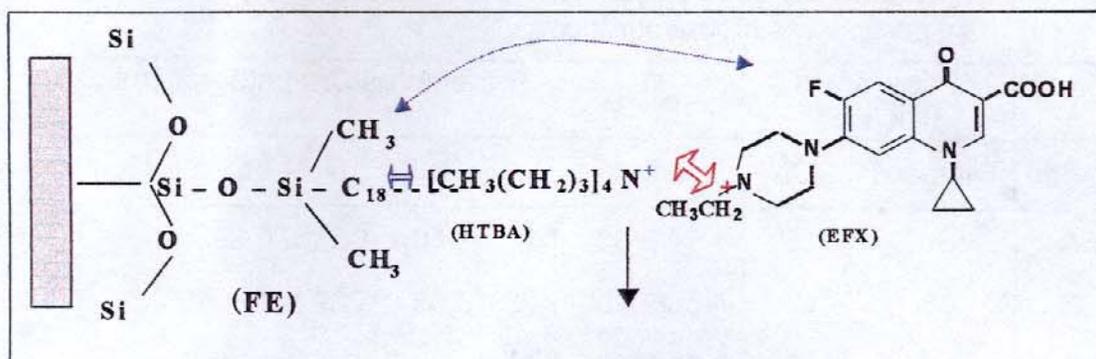


Figura 15 - Mecanismo de separação sugerido utilizando a CLPI.

Embora os resultados obtidos, quanto aos parâmetros cromatográficos, permitiriam o desenvolvimento de um método para a determinação de EFX e CFX por CLPI, buscou-se uma alternativa ao uso dos reagentes PI, já que são reagentes corrosivos, que podem afetar a vida útil da coluna cromatográfica, comprometendo também a repetibilidade dos resultados.

IV.1.2 - Otimização da composição da fase móvel - cromatografia em fase reversa/troca iônica

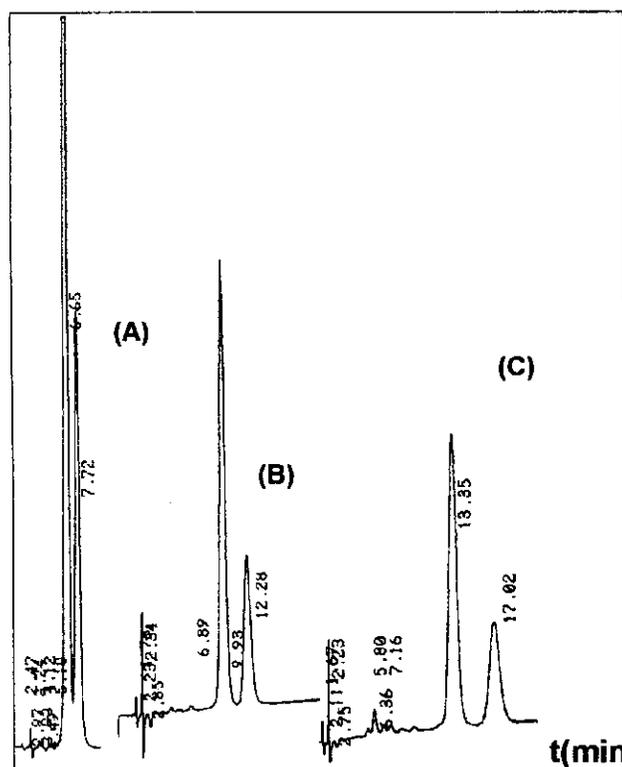
Procurando evitar o emprego de reagente par iônico, na FM, pelos motivos anteriormente expostos, foi avaliada uma FE apolar, contendo um grupo trocador catiônico (mixed mode, 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m, Alltech, EUA). Segundo o fabricante o trocador catiônico é um grupo carboxila e a fase apolar é octadecil.

Inicialmente, foi avaliada a percentagem de ACN na FM composta de tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN na separação cromatográfica de EFX e CFX e os resultados estão apresentados na Tabela 10. Apesar dos analitos apresentarem um tempo de retenção maior, foi escolhida como FM aquela com uma percentagem de 10 % de ACN. Os cromatogramas são mostrados na Figura 16.

Tabela 10 - Efeito da composição da fase aquosa/orgânica da FM sobre os parâmetros cromatográficos.

Figura	Fase móvel (% v/v)		Parâmetros Cromatográficos				
	Tampão*	ACN	k_1/k_2	α	R_s	N_1/N_2 (m ⁻¹)	t_{R1}/t_{R2} (min)
16A	85	15	1,64/2,08	1,27	1,18	5367/7293	4,70/5,48
16B	88	12	4,58/5,90	1,29	3,55	23947/36613	9,93/12,3
16C	90	10	6,99/9,19	1,31	2,63	9787/15913	13,4/17,0

*tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 2,5. Sendo 1 = CFX e 2 = EFX.

**Figura 16** - Cromatogramas obtidos na otimização da FM para separação da EFX e CFX (A, B e C, condições especificadas na Tabela 10).

Utilizando-se como FM tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹/ACN (90/10 v/v), foi avaliado o efeito do pH no intervalo de 2,0 a 4,0 na separação de EFX e CFX (Tabela 11). O tempo de retenção aumenta em função do pH para ambos analitos, sendo que em pH 4,0 não há eluição de EFX e CFX até 40 min. Foi verificado que a

resolução entre EFX e CFX aumenta com o aumento do pH da FM. O melhor compromisso entre todos os parâmetros cromatográficos é obtido em pH 2,0 e 2,5. Portanto, evitando trabalhar em condições de pH no limite da coluna, ou seja, pH 2,0, foi escolhido o pH 2,5 como ótimo. Os cromatogramas são mostrados na Figura 17.

Tabela 11 - Efeito do pH sobre os parâmetros cromatográficos de EFX e CFX.

Figura	Fase móvel (%)		Parâmetros Cromatográficos				
	pH	ACN	k_1/k_2	α	R_s	$N_1/N_2(m^{-1})$	t_{R1}/t_{R2} (min)
17A	2,0	10	7,35/9,25	1,26	2,63	14120/21320	14,9/18,3
17B	2,5	10	6,99/9,19	1,31	2,63	9787/15913	13,4/17,0
17C	3,0	10	7,98/11,2	1,40	2,95	16713/7647	16,2/21,9
17D	3,5	10	9,48/14,2	1,49	3,92	18553/9700	17,1/26,0

Sendo 1 = CFX e 2 = EFX.

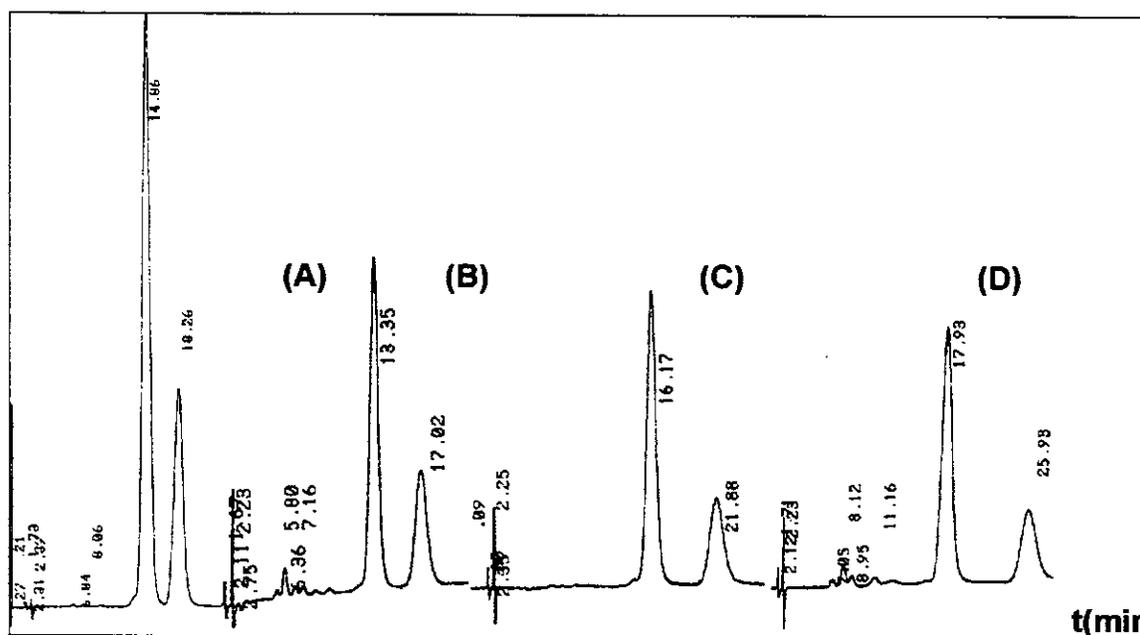


Figura 17 - Cromatogramas obtidos na otimização da FM para separação da CFX da EFX (A, B, C e D, condições especificadas na Tabela 11).

Ainda, foi avaliada a separação da EFX e CFX de outras FQ, a fim de se escolher um composto que possa ser empregado como padrão interno. As

substâncias avaliadas foram a perfloxacina (PFX), a norfloxacin (NFX) e a ofloxacina (OFX), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 18.

O padrão interno ofloxacina (OFX), foi escolhido para auxiliar na quantificação dos analitos, devido a eluir próximo ao tempo de retenção dos analitos de interesse, sem interferir na separação cromatográfica dos mesmos (Figura 18).

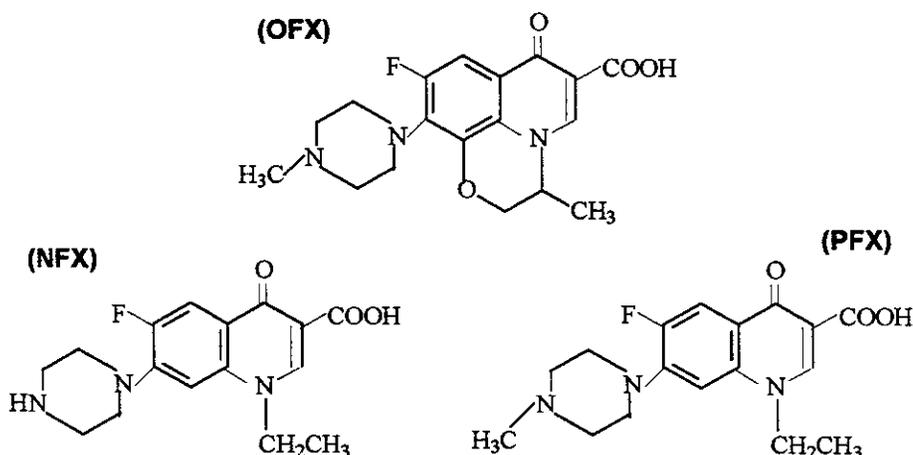


Figura 18 - Estruturas da ofloxacina (OFX), norfloxacin (NFX) e perfloxacin (PFX).

IV.1.3 - Condições cromatográficas para separação de OFX, CFX e EFX

Para diminuir o tempo de análise, sem comprometer a eficiência de separação dos analitos estudados, foi avaliado o emprego de um eluição por gradiente linear no lugar da eluição isocrática.

A FM otimizada para separação da OFX, CFX e EFX foi, portanto: tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN com a seguinte programação do eluição por gradiente: de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v. A quantificação foi feita utilizando DAD em 278 nm para EFX e CFX e 294 nm para OFX, uma vez que esses compostos apresentam o máximo de absorção nesses comprimentos de onda. Um cromatograma obtido nas condições acima e os respectivos espectros de absorvância são apresentados na Figura 19. O mesmo cromatograma é apresentado em 3D na Figura 20.

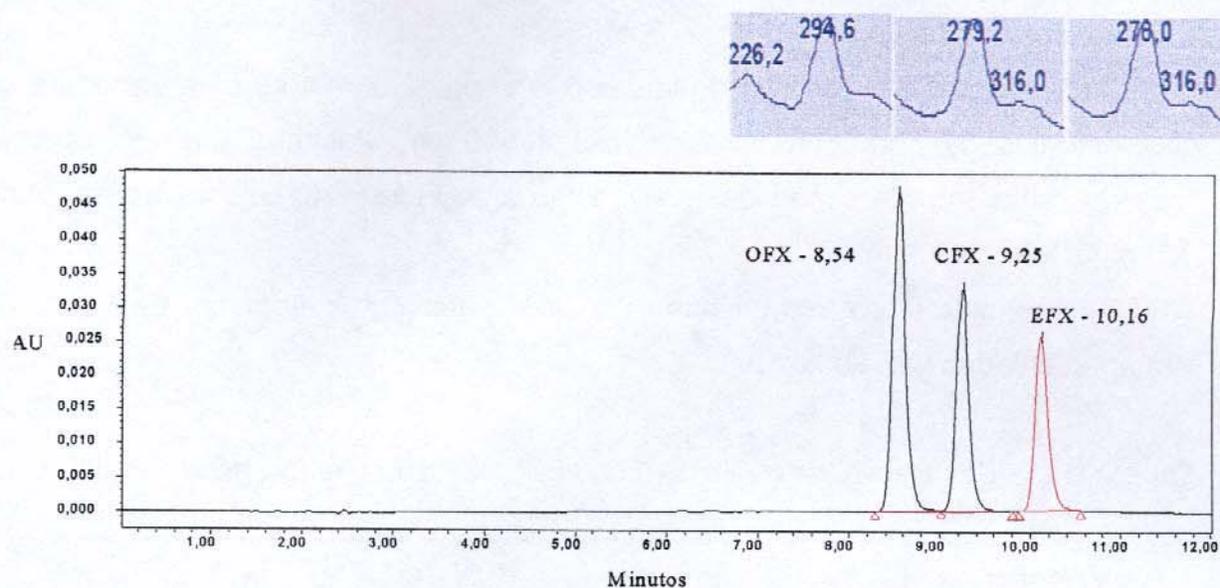


Figura 19 - Cromatograma da separação da OFX, CFX e EFX com a FM tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN, gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica.

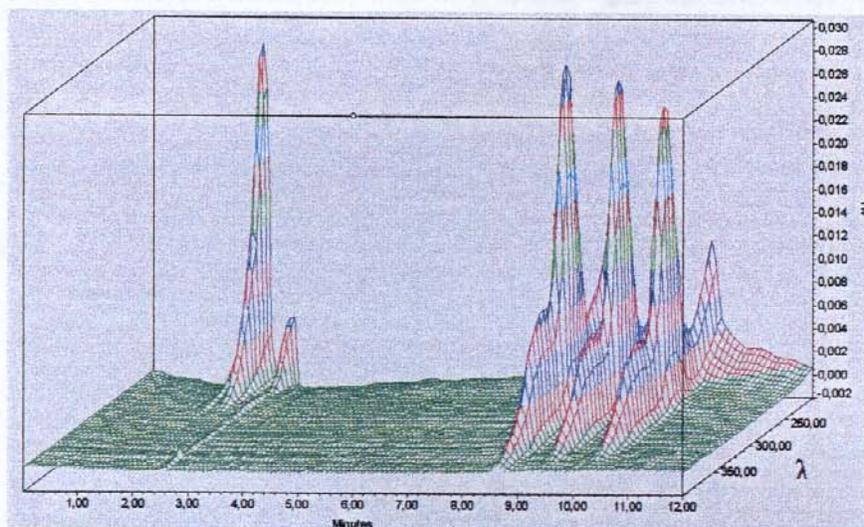


Figura 20 - Cromatograma 3D da separação da OFX, CFX e EFX obtido nas condições descritas na Figura 19.

É possível monitorar cada pico da corrida cromatográfica em seu λ_{max} de absorção, como pode ser verificado na Figura 19. A OFX absorve mais intensamente

em 294 nm, enquanto a CFX e a EFX em 279,2 e 278 nm respectivamente, tendo sido monitoradas neste estudo em 278 nm.

Com o detector de arranjo de fotodiodos, é possível efetuar uma varredura de comprimentos de onda, na faixa de 180 a 800 nm. Assim é possível obter o cromatograma em três dimensões (3D), como o da Figura 20, cuja varredura foi de 200 nm a 400 nm.

Os parâmetros cromatográficos calculados para o cromatograma da Figura 19 são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Separação das FQ na condição otimizada empregando eluição por gradiente.

Analitos 1/2	k_1/k_2	α	R_s	$N_1/N_2 (m^{-1})$	$t_{R1}/t_{R2} (min)$
CFX/EFX	3,45/3,87	1,12	3,32	130567/156500	9,25/10,13
OFX/CFX	3,11/3,59	1,16	3,82	111320/139173	8,54/9,55
OFX/EFX	3,11/3,87	1,25	6,00	111320/156500	8,54/10,13

Uma vez otimizadas as condições experimentais para a separação de EFX e CFX, foi realizado o teste de adequabilidade do sistema comparando os dados de quando a coluna analítica foi adquirida e após 6 meses de uso contínuo (aproximadamente 1000 determinações). Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Teste de adequabilidade do sistema cromatográfico.

Parâmetros*	CFX/EFX (30/10/2002)	CFX/EFX (30/04/2003)
k_{CFX}/k_{EFX}	4,1/4,4	3,4/3,7
α	1,07	1,09
R_s	2,2	1,3
$N_{CFX}/N_{EFX} (m^{-1})$	177513/128067	37327/42813

A partir dos resultados obtidos verifica-se que após seis meses de uso contínuo a coluna analítica perde por volta de cinco vezes em eficiência (N) e há uma diminuição do Rs entre os analitos, comprometendo a seletividade do método.

IV.1.4 - Estabilidade da EFX e da CFX em solução

Antes de validar a metodologia analítica é necessário verificar a estabilidade das soluções analíticas utilizadas. As estabilidades das soluções padrões de EFX e CFX foram avaliadas mediante preparo da solução de concentração $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, que foi mantida em frasco âmbar a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante trinta dias. Após esse período de 30 dias, foi verificado um decréscimo na concentração de 2 % para CFX e 2 % para EFX. Segundo Shabir (2003), a variação aceitável é de 2 % entre a concentração preparada no dia e após 24 h. Como a variação da concentração desta solução de EFX e CFX não foi superior a 2 % após 30 dias, a solução de trabalho de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada mensalmente.

A solução de trabalho $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi diluída para a concentração de $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foi injetada no cromatógrafo a líquido durante 5 dias consecutivos e teve sua concentração diminuída em 9 % para CFX e 11 % para EFX. Tendo em vista que essa variação na concentração é expressiva, recomenda-se preparar diariamente a solução de trabalho diluída. Depois de estabelecidas as condições analíticas, procederam-se com a validação do método, inicialmente visando a determinação de EFX em medicamentos de uso veterinário.

IV.2 - Medicamentos de uso veterinário

O desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando a CLAE para análise de medicamentos tem recebido atenção especial nos últimos anos, devido a sua importância no controle de qualidade e testes de equivalência de medicamentos.

O método descrito foi validado para determinação de EFX em medicamentos de uso veterinário, mas pode ser aplicado à determinação de CFX em medicamentos de uso humano, desde que seja completamente validado para determinação de CFX.

IV.2.1 - Validação do método para a determinação de EFX em medicamentos

A qualidade e a credibilidade de um resultado analítico fundamentam-se nos cuidados com os quais o analista se cerca para produzir dados que expressem o valor real da medida obtida. A primeira etapa para obtenção de resultados confiáveis está na validação da metodologia analítica escolhida.

Para a validação da metodologia foram selecionadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão (repetibilidade) e robustez do método. Os parâmetros a serem avaliados dependem do objetivo a que se propõe o método e foram descritos por Shabir (2003), Chasin et al. (1998), Bruce et al. (1998) e pela Comunidade Européia (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC).

Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Para determinar a seletividade de um método, o analito, a matriz com e sem o analito, as impurezas provenientes da matéria-prima ou do processo, subprodutos, produtos de degradação ou metabólitos, devem ser avaliados para verificar se interferem ou não com o sinal analítico.

A seletividade do método foi avaliada por testes de degradação da EFX após aquecimento, em meio ácido, básico e oxidante conforme descrito no item III.3.2.1, com o objetivo de determinar se os produtos de degradação interferem na determinação da EFX. Os resultados foram avaliados em relação à concentração inicial e a recuperada após exposição da EFX nas diferentes condições experimentais (Tabela 14). Os cromatogramas são apresentados na Figura 21.

Tabela 14 - Estudo da degradação da EFX.

	Condições experimentais	Recuperação (%)*
1	Aquecimento entre 50 - 60 °, 60 min	68 ± 4
2	HCl 0,1 mol L ⁻¹	68 ± 3
3	NaOH 0,1 mol L ⁻¹	42 ± 4
4	Oxidante H ₂ O ₂ 3 % v/v	72 ± 1

*Valores expressos como média (n=2) ± D (desvio médio).

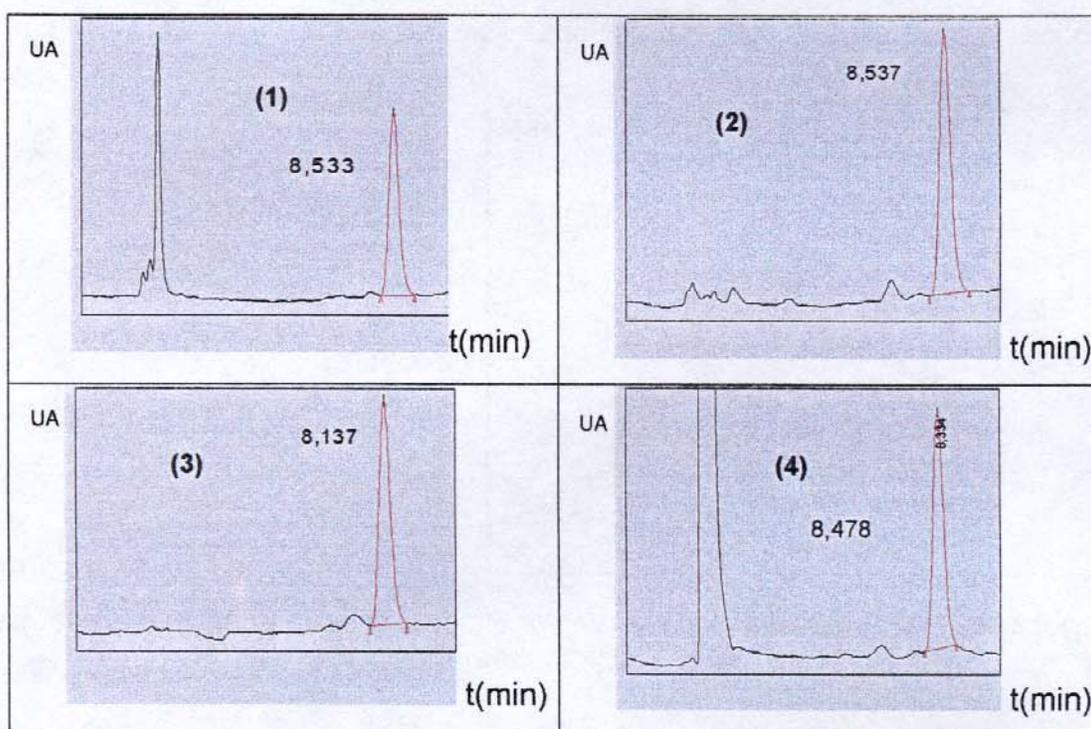


Figura 21 - Cromatogramas da EFX após degradação com: (1) Aquecimento; (2) HCl 0,1 mol L⁻¹; (3) NaOH 0,1 mol L⁻¹ e (4) H₂O₂ 3 % v/v.

Verificando os dados descritos na Tabela 14 e os cromatogramas apresentados na Figura 21, observa-se que nas condições avaliadas, a concentração da EFX quando comparada a concentração inicial diminuiu igualmente em meio ácido e sob aquecimento. Ainda, sob aquecimento foi observado um pico intenso no t_R de 2,11 min, mas que não interfere na quantificação da EFX. O meio básico é o que mais

afeta a estabilidade da EFX, embora todas as demais condições levem a uma diminuição na recuperação da EFX. No meio de peróxido de hidrogênio aparece um pico intenso no t_R de 2,11 min, que não interfere na quantificação da EFX. Todos os compostos formados nos testes de degradação apresentam tempos de retenção menores do que o da EFX, indicando a formação de compostos mais polares. Todos os produtos de degradação formados não afetam a seletividade do método.

Sensibilidade, faixa linear e linearidade

Os parâmetros de validação: sensibilidade, faixa linear e linearidade foram obtidas a partir de cinco curvas analíticas as quais são apresentadas na Figura 22.

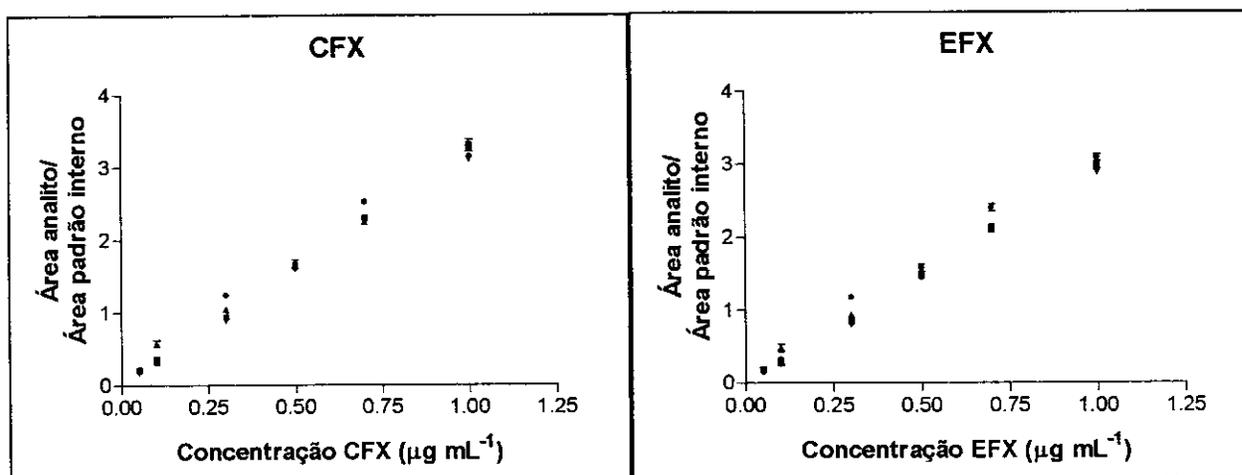


Figura 22 - Gráficos das cinco curvas analíticas feitas em dias diferentes, para CFX e EFX, utilizando o padrão interno OFX.

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta do detetor varia em função da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

A faixa linear é definida como a faixa de concentração onde a sensibilidade do método, pode ser mantida constante.

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais as concentrações do analito dentro da faixa linear

da curva analítica. O coeficiente de correlação é utilizado para avaliar a linearidade da curva analítica e deve ser maior do que 0,98.

A faixa linear, sensibilidade e linearidade para a EFX e CFX foram calculados conforme descrito no item III.3.2.1 e os resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Figuras de mérito do processo de validação (faixa linear, sensibilidade e linearidade).

Parâmetros estudados	CFX	EFX
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,0500 à 1,00	0,0500 à 1,00
Sensibilidade* (B) $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$	$3,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$
Linearidade* (r)	$0,998 \pm 0,002$	$0,997 \pm 0,003$

*Valores expressos como média (n=5) \pm estimativa do desvio padrão absoluto.

O procedimento analítico mostrou-se linear na faixa de concentração avaliada. As curvas analíticas tiveram uma linearidade maior que 0,99.

Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é definido como o nível mínimo que o analito pode ser medido com exatidão e precisão. Em alimentos, é considerado como o nível de concentração determinado por um sinal que exceda dez vezes o desvio padrão relativo do ruído ou do ruído da amostra do branco. Pode também ser calculado a partir da curva analítica, sendo que

$$\text{LOD} = k s_{y/x}/m \quad (6)$$

onde, k = constante igual a 3, $s_{y/x}$ estimativa do desvio padrão da curva e m o coeficiente angular da curva analítica e

$$\text{LOQ} = k s_{y/x}/m \quad (7)$$

onde, k = constante igual a 10.

Para análise de medicamentos, os LOD e os LOQ foram calculados para a EFX a partir das cinco curvas analíticas. Embora seja possível determinar esses valores também para a CFX, esses não foram estabelecidos, pois a CFX é um metabólito da

EFX e não está presente no medicamento de uso veterinário a base de EFX. Cabe destacar, ainda, que a determinação dos LOD e LOQ para medicamentos não faz parte do protocolo de validação. Considerando uma diluição do medicamento de 20.000 vezes, os LOD e LOQ estabelecidos para a EFX são 1,0 e 3,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Robustez

A robustez do método descreve a estabilidade do método cromatográfico. Pode ser determinada através da análise individual ou simultânea dos parâmetros mais sujeitos a variação como: pH, temperatura e composição da fase móvel. A transferência do método de um laboratório para outro também pode ser considerada um teste de robustez.

Quanto a robustez do método avaliado, mudanças na faixa de pH entre 2,00 e 3,00, em unidades de 0,20; não causam mudanças nos tempos de retenção das FQ sob estudo. Pequenas mudanças na composição da fase móvel no modo de eluição isocrático alteram o t_R dos analitos, como pode ser observado nas Tabelas 7 (IV.1.1) e 10 (IV.1.2). Assim, o método não é robusto quando é considerada a percentagem de solvente da composição da fase móvel.

Precisão

A precisão (repetibilidade e reprodutibilidade): é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma amostra. Pode ser estimada através do coeficiente de variação (estimativa do desvio padrão relativo). A repetibilidade é quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, para análise da mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, em um curto espaço de tempo. A reprodutibilidade por sua vez é quando os resultados são obtidos usando o mesmo método e a mesma amostra, em diferentes laboratórios, por analistas diferentes, em diferentes equipamentos. Tendo em vista que ensaios de reprodutibilidade são difíceis de serem executados, a precisão intra e inter-ensaio foram avaliadas.

A precisão intra-ensaio foi avaliada através da repetibilidade, analisando o ponto do meio da curva analítica, cuja concentração foi de $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de EFX e CFX, empregando a OFX como padrão interno (concentração de $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$). A precisão inter-ensaio foi avaliada mediante análise da mesma solução empregada no ensaio anterior, em 5 dias consecutivos. Os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Precisão intra e inter ensaio para uma concentração do analito de $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ensaio	CFX (RSD)	EFX (RSD)
Precisão intra-ensaio	0,6 %	0,7 %
Precisão inter-ensaio	2,5 %	2,7 %

RSD: estimativa do desvio padrão relativo.

Os valores de repetibilidade intra-ensaio e inter-ensaio estão adequados conforme as recomendações internacionais para medicamentos de 1 e 2 %, respectivamente (SHABIR, 2003).

Exatidão

A exatidão expressa quanto os resultados obtidos se aproximam do valor verdadeiro. Pode ser determinado: (i) por comparação dos resultados obtidos pelo novo método com os obtidos por um método de referência; (ii) por análise de material de referência certificado; (iii) por adição de padrão ou (iv) por testes de recuperação.

A exatidão do método proposto foi avaliada mediante teste de recuperação com a análise de dois medicamentos de uso veterinário, denominados de A e B, disponíveis no mercado para uso em aves. Para a realização do teste de recuperação, as amostras de medicamentos foram fortificadas com 50 % da concentração do princípio ativo determinado na amostra e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados obtidos na determinação de EFX nos medicamentos de uso veterinário A e B, concentração declarada de 100 mg mL⁻¹.

Medicamento	Concentração média EFX*	Nível de fortificação 50 %*
A	110 ± 4 mg mL ⁻¹	101 ± 2 %
B	130 ± 10 mg mL ⁻¹	103 ± 6 %

*Valores expressos como média (n= 3) ± ts/√n, com 95% de confiança.

A recuperação de 101 % para o medicamento A e 103 % para o B indicam que não existe efeito matriz e que o método está livre de erros sistemáticos.

O valor nominal de EFX nos dois medicamentos é de 100 mg mL⁻¹. Os valores determinados estão apresentados na Tabela 17. Como não há na literatura informações para controle de qualidade da EFX em medicamentos de uso animal, foi considerado neste estudo a USP XXV (2002), que define parâmetros para a CFX em medicamentos de uso humano e propõe que o teor do princípio ativo CFX deve estar entre 90 a 110 % do valor nominal declarado pelo fabricante do medicamento. Embora o medicamento A apresente um teor de 110 % do valor declarado e o B de 130 %, nada pode ser afirmado quanto a qualidade dos mesmos em função da quantidade do princípio ativo, uma vez que não foi realizada uma amostragem segundo as recomendações da farmacopéia. Cabe destacar, que este estudo não visou o controle de qualidade, mas sim a avaliação da exatidão do método.

IV.3 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma de frango

IV.3.1 - Preparo de amostra de plasma

Vários métodos analíticos que utilizam a CLAE para determinação de FQ em materiais biológicos têm o preparo de amostra desenvolvido a partir da extração dos analitos em um solvente de extração, geralmente uma fase orgânica. Em seguida pode ser utilizada a extração em fase sólida (EFS) para efetuar a limpeza do extrato, remover os interferentes e pré-concentrar o analito.

Uma das dificuldades existentes em isolar FQ do plasma está associada com a propriedade destes compostos de se ligarem às proteínas da matriz. Após testar procedimentos de extração com: tampão fosfato, pH 7,0 conforme recomendado por Delepine et al. (1998); HCl 1 mol L⁻¹ segundo van Vyncht et al. (2002); ácido acético + ACN (5 + 95 v/v) conforme Rose et al. (1998) e ATCA 10% + ACN (80 + 20 v/v) de acordo com Posyniak et al. (2001), neste trabalho foi utilizada a solução de extração ATCA 10% + ACN (80 + 20 v/v) devido a sua maior capacidade em precipitar as proteínas das matrizes em estudo.

Uma vez precipitadas as proteínas do plasma, separadas por centrifugação e as FQ extraídas, fez-se necessário a limpeza do extrato e a concentração dos analitos. Para tanto, optou-se pelo emprego da EFS. Esse procedimento consiste na passagem do extrato por um cartucho contendo um adsorvente e tem a finalidade de separar o analito dos interferentes e concentrar o analito. Basicamente a EFS é realizada em quatro etapas: condicionamento do cartucho, aplicação da amostra, lavagem e eluição.

Na EFS foi utilizado o sistema à vácuo (Figura 5, pág. 39) que permite efetuar a limpeza do extrato utilizando 12 cartuchos por vez, mantendo a vazão dos solventes constante em todas as etapas (3 mL min⁻¹).

Utilizando cartuchos de EFS dois tipos de FE foram avaliados para efetuar a limpeza e pré-concentração das FQ do plasma: (A) octadecil (Bond Elut, 200 mg, 3 mL, Varian) e (B) fase mista, octadecil + trocador iônico (narc-2, 125 mg, 3 mL, J.T. Baker). Os procedimentos foram descritos no item III.3.3.1.

(A) EFS - octadecil

Inicialmente, seguiu-se o procedimento de extração de resíduos de FQ em tecidos de frangos, descrito por Posyniak et al. (2001). A precipitação das proteínas foi feita com ATCA 10 % + ACN (80 + 20 v/v). Como solventes de eluição foram avaliados ACN e MeOH, sendo que em nenhum dos casos houve recuperação superior a 50 %. Houve um ganho na recuperação quando se utilizou na eluição tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN (1:1 v/v), conforme sugerido por Gigoso et al. (2000). Porém, mediante este procedimento não foi possível separar e recuperar mais que 50 % das FQ (padrão analítico sem a matriz).

(B) EFS - octadecil + trocador catiônico (Narc -2)

Considerando-se que esse tipo de fase estacionária foi a mais adequada para a separação da EFX e CFX por CLAE, testou-se o cartucho de fase mista (octadecil com trocador catiônico, Narc-2). Em termos de eficiência de extração, os resultados foram melhores que dos outros cartuchos avaliados. Os resultados obtidos utilizando-se o cartucho Narc-2 somente com uma solução dos padrões analíticos (EFX e CFX) diluído na solução de extração (concentração final 1,00 µg mL⁻¹) e utilizando o extrato do plasma com adição de 0,500 µg, são descritos na Tabela 18.

Tabela 18 - Recuperação de EFX e CFX em plasma utilizando cartuchos Narc-2.

Solução aplicada ao cartucho Narc-2	Recuperação CFX	Recuperação EFX
Solução padrão diluída em 10 mL da SE*	87 ± 2%	91 ± 7%
Plasma diluído na SE* (1:1 v/v)	49 ± 2%	55 ± 6%

*Valores expressos como média (n=3) ± SD (estimativa do desvio padrão). Procedimento B, (III.3.3.1, pág. 38). *SE = solução extratora composta de ácido tricloroacético 10 % + ACN (80 + 20 v/v).

O pH ácido do extrato aplicado ao cartucho não somente facilita a liberação dos antimicrobianos ligados às proteínas presentes na matriz, como ativa a ligação dos analitos aos sítios de troca-catiônica da fase do cartucho, através do grupo amino protonado do analito. A primeira etapa de lavagem com água é necessária para remover os interferentes polares não-iônicos e iônicos do extrato da matriz, embora se mantenha a ligação dos analitos básicos aos sítios de troca catiônica. A segunda etapa da lavagem, com MeOH, tem o propósito de remover interferentes hidrofóbicos, incluindo analitos ácidos e neutros. No final, os analitos básicos estão retidos nos sítios trocadores do cartucho e são eluidos com uma solução de MeOH com um alto valor de pH. A mudança no valor do pH rompe a ligação dos analitos com o trocador iônico.

Tendo em vista que os valores de recuperação obtidos para os analitos estão em torno de 50 % e que não é recomendável corrigir esses valores quando estiverem fora da faixa de 80 a 110 % para esse nível de fortificação (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC), foi construída a curva analítica fortificando amostras de plasma do grupo controle (branco) com concentrações crescentes da solução padrão. Todas as amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento completo de análise e adicionadas de padrão interno anterior ao preparo de amostra.

IV.3.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma de frango

O plasma é uma matriz muito mais complexa que o medicamento, possuindo grande quantidade de proteínas, que afetam a recuperação dos antimicrobianos da matriz biológica. Foi necessário, para garantir a confiabilidade dos resultados, validar a metodologia analítica desenvolvida para realizar a análise dessa matriz.

Para fins de validação do método para a determinação de EFX e CFX em plasma foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. As análises cromatográficas foram feitas conforme descrito em III.3.1.3.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise da amostra do plasma de frango do grupo controle (branco), submetida ao processo de extração descrito no item III.3.3.1. Um cromatograma do extrato é apresentado na Figura 23. Observam-se dois picos nos tempos de retenção 2,39 e 5,11 min. Embora esses picos apresentem uma área grande, não interferem na determinação dos analitos, porque eluem antes. Assim, o método desenvolvido apresenta seletividade adequada para a determinação de EFX e CFX em plasma. O cromatograma 3 D da amostra do branco do plasma é apresentado na Figura 23.

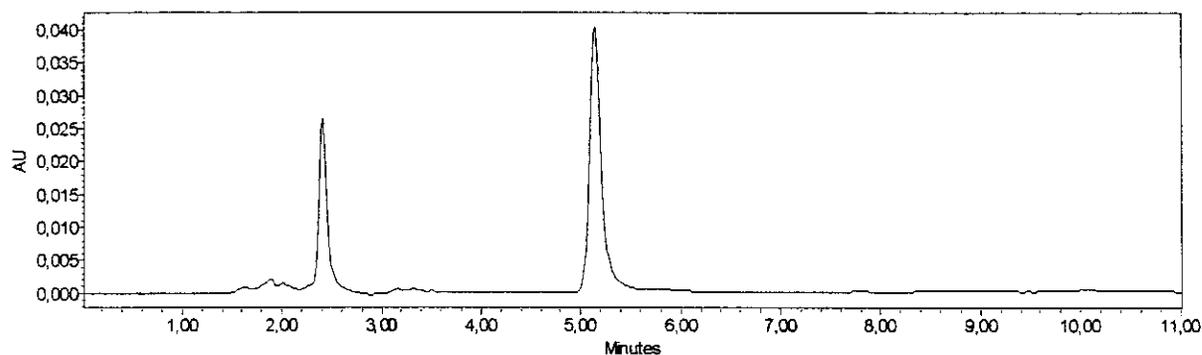


Figura 23 - Cromatograma do branco do plasma. FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE: C18-catiônica.

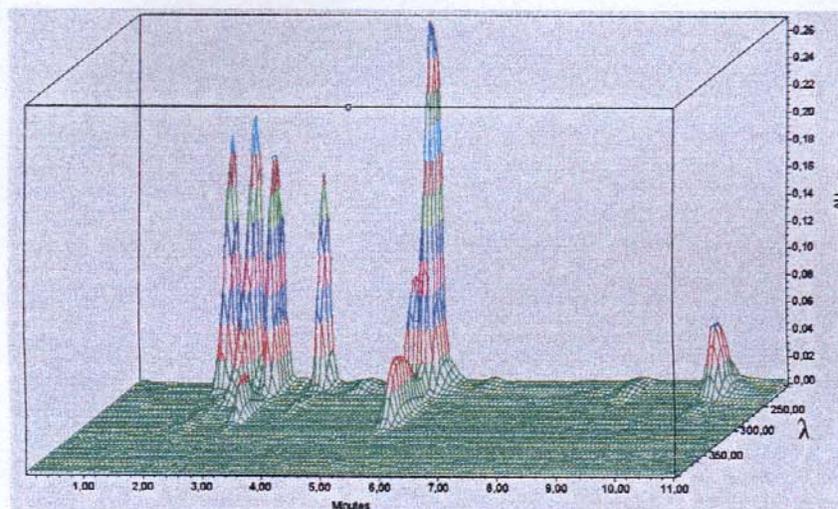


Figura 24 - Cromatograma 3D do branco do plasma da obtido nas condições descritas na Figura 23.

É apresentado, na Figura 25, um cromatograma de uma amostra do plasma de frango do grupo controle fortificado com OFX, CFX e EFX, analisada conforme descrito em III.3.3.3.

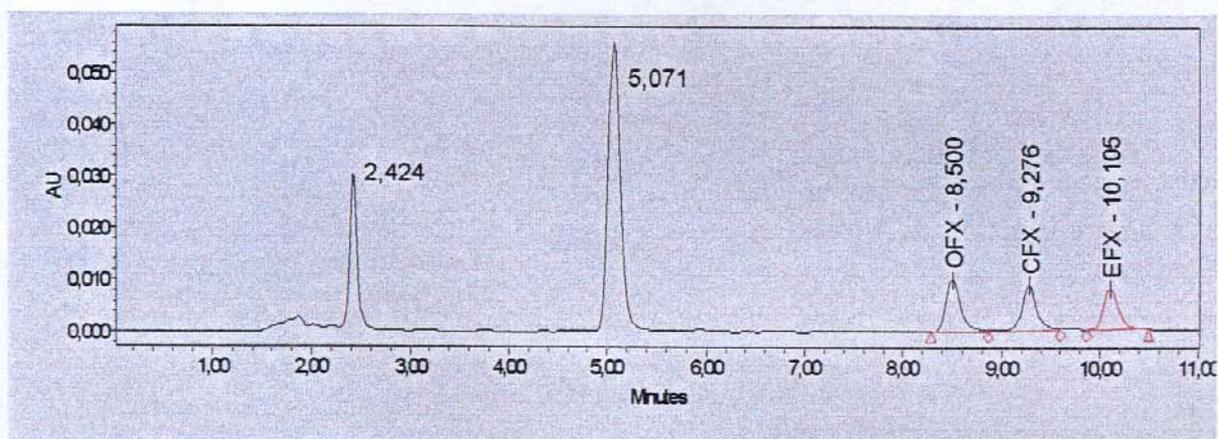


Figura 25 - Cromatograma do extrato do plasma com adição de $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CFX e EFX e de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OFX. FM tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE: C18-catiônica.

O detector de arranjo de fotodiodos (DAD) permite que os compostos separados na corrida cromatográfica sejam monitorados em diferentes comprimentos

de onda. Assim é possível quantificar analitos que tenham o máximo de absorção em comprimentos de onda diferentes, como é o caso da OFX ($\lambda_{\text{max}} = 294 \text{ nm}$) e da CFX e EFX ($\lambda_{\text{max}} = 279,2 \text{ nm}$) otimizando assim a detectabilidade do método. O composto que elui em 5,071 min apresenta absorvância máxima em 279,2 nm.

Faixa linear, linearidade e sensibilidade

Foi feita uma curva analítica, pelo método de padronização interna, plotando-se a razão entre as áreas da EFX/OFX e CFX/OFX *versus* concentração do analito (Figura 26). Aliquotas de 500 μL de plasma foram fortificadas no intervalo de concentração de 0,250 a 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foram submetidas, anterior a análise cromatográfica, ao procedimento completo de preparo e análise de amostra (III.3.3.3).

O método desenvolvido é linear na faixa de concentração estudada, com linearidade de 0,9992 e 0,9996 para a EFX e CFX, respectivamente. A equação da reta obtida para a EFX foi $y = 0,01608 + 0,7971x$ e para CFX foi $y = -0,04273 + 0,9486x$, onde y: razão das áreas de EFX/OFX, CFX/OFX e x: concentração da FQ em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

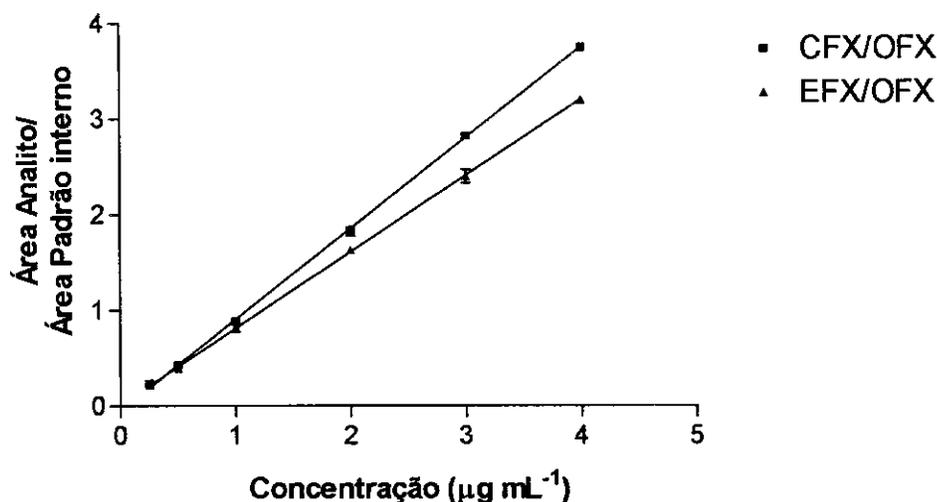


Figura 26 - Curva analítica com adição de EFX, CFX e OFX ao plasma do grupo controle.

Limite de detecção e quantificação

O LOD (razão sinal/ruído igual a 3) e LOQ (razão sinal/ruído igual a 10) foram calculados para CFX e EFX e são 0,0600 e 0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram confirmados com a injeção dessas concentrações no cromatógrafo a líquido, nas mesmas condições analíticas em que foi feita a curva. Os valores descritos são maiores que os valores reportados por Knoll et al. (1999), porém, os autores utilizaram a CLAE com detector de fluorescência na determinação de EFX e CFX em plasma de frangos. Os LOQ calculados pelos autores foram de 0,0600 e 0,0200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para EFX e CFX, respectivamente. Cabe destacar, que o detector de fluorescência é mais sensível para essa classe de compostos do que o detector de arranjo de fotodiodos.

Rao et al. (2002a) empregaram a CLAE com detector UV para determinar EFX e CFX em plasma de cabras. Apesar dos autores utilizarem um detector UV, o LOQ calculado foi menor do que o obtido neste estudo, sendo de 0,0300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para EFX e para CFX, porém, não foi reportado como este valor foi calculado.

Precisão

A precisão foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) dos resultados obtidos no inter-ensaio.

Uma curva analítica foi construída no primeiro dia de análise das amostras de plasma. A cada dia de análise dessas amostras, um ponto da curva analítica (plasma fortificado com EFX e CFX) foi analisado no cromatógrafo a líquido e verificado a percentagem de recuperação. As concentrações avaliadas foram 0,500; 1,00; 2,00 e 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A variação média ($n = 4$) dos pontos em relação à curva foi de 10 % para CFX (99 ± 10 %) e 7,3 % para EFX (96 ± 7 %). Foi estabelecido como critério que se a variação fosse maior que $3s/\sqrt{n}$ uma nova curva analítica seria construída. Como o valor determinado foi menor, não foi necessária a construção de uma nova curva analítica durante os dias de análise.

Os valores deste estudo corroboram os de Rao et al. (2002a) que relataram que tanto a precisão intra como inter-ensaio foi de 8 % para CFX e para EFX. Os autores não descrevem quais concentrações foram avaliadas, o número de determinações e em quantos dias a precisão inter-ensaio foi avaliada. No entanto, valores menores para a precisão intra e inter-ensaio foram apresentados por Knoll et al. (1999), de 2,7 e 3,8 % , respectivamente, para uma concentração de EFX de 0,500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação. Seis amostras de plasma de aves do grupo controle (branco) foram fortificadas com três concentrações de EFX e CFX. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados dos testes de recuperação de EFX e CFX em plasma de aves.

Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CFX		EFX	
	Concentração Determinada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração determinada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
0,50	0,52 \pm 0,01	103	0,48 \pm 0,01	95
1,00	0,99 \pm 0,03	99	1,01 \pm 0,08	101
2,00	1,97 \pm 0,07	99	2,03 \pm 0,04	101
Média	-	100 \pm 2	-	99 \pm 3

*Valores expressos como média \pm D (desvio médio de n=2).

As percentagens de recuperação nos três níveis de fortificação avaliados foram em média 100 \pm 2 e 99 \pm 3 % para CFX e EFX, respectivamente, e estão de acordo com os valores determinados pela CE, entre 80 e 110% (EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC), confirmando a exatidão do método.

Os valores de recuperação determinados neste estudo são maiores que os de recuperações reportadas por Knoll et al. (1999) que foram de 92 % para EFX e 79 % para CFX. A recuperação reportada por Rao et al. (2002a) foi a mesma para EFX e

para CFX de 93 %. Entretanto, nenhum dos autores relata o nível de concentração avaliado nos testes de recuperação.

IV.4 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango

IV.4.1 - Preparo de amostra de músculo

O procedimento de extração para a análise de músculo foi feita conforme item III.3.4.1. Também para essa matriz foi empregada a EFS utilizando cartucho Narc-2. São apresentados na Tabela 20 os resultados obtidos com padrão analítico (EFX e CFX $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) e com 1,0 g de amostra de músculo adicionados de $0,500 \mu\text{g}$ de EFX e CFX.

Tabela 20 - Recuperação de EFX e CFX em músculo, empregando EFS com cartuchos Narc-2.

Solução aplicada ao cartucho Narc-2	Recuperação CFX	Recuperação EFX
Solução padrão diluída em 10 mL da SE*	$87 \pm 2\%$	$91 \pm 7\%$
1,0 g de amostra em 10 mL da SE*	$70 \pm 1\%$	$64 \pm 2\%$

*Valores expressos como média ($n = 3$) \pm D (desvio médio). SE = solução extratora composta de ácido tricloroacético 10% + ACN (80 + 20 v/v). Procedimento B (III.3.3.1, pág. 38).

As percentagens de recuperação, tanto da CFX como da EFX, foram menores na extração dos analitos da matriz, quando comparadas com a ausência desta, confirmando que a matriz exerce um efeito sobre os analitos estudados por ser complexa, rica em proteínas e gorduras. Portanto, igualmente ao plasma, também para o músculo é recomendado que a curva analítica seja construída na presença da matriz biológica.

IV.4.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango

A metodologia analítica desenvolvida para a determinação de EFX e CFX foi validada para realizar a análise do músculo. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de amostra do músculo de frango do grupo controle (branco), submetida ao processo de extração (III.3.4.1). Um cromatograma do branco é apresentado na Figura 27.

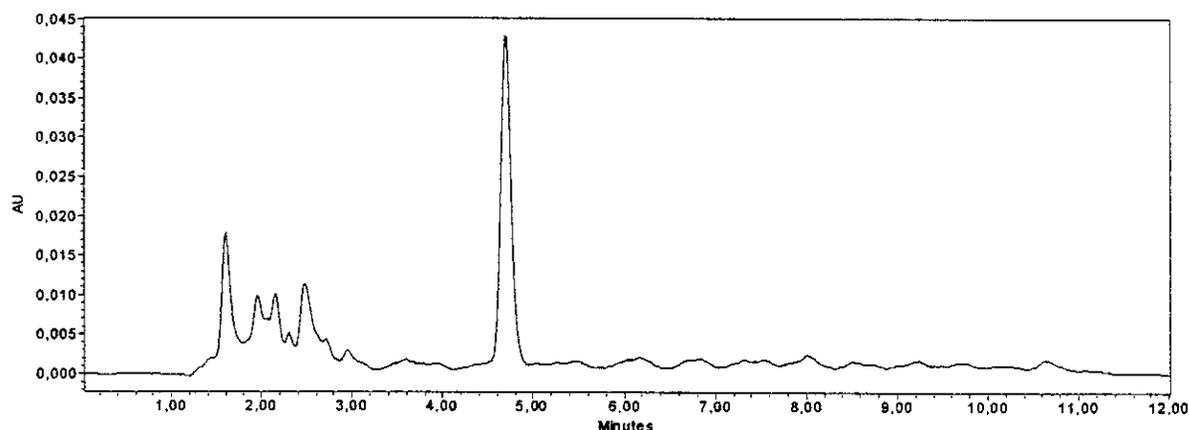


Figura 27 - Cromatograma do extrato do branco do músculo. FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE C18-catiônica.

Observa-se na Figura 27 vários picos do início do cromatograma até um tempo de 5 min, mas, estes não interferem na detecção da CFX e EFX. Portanto, o método apresenta seletividade adequada para a determinação de EFX e CFX em músculo de frango.

O cromatograma apresentado na Figura 28 refere-se a uma amostra de músculo de frango do grupo controle em que foram adicionados OFX, CFX e EFX sendo em seguida submetida ao processo de extração.

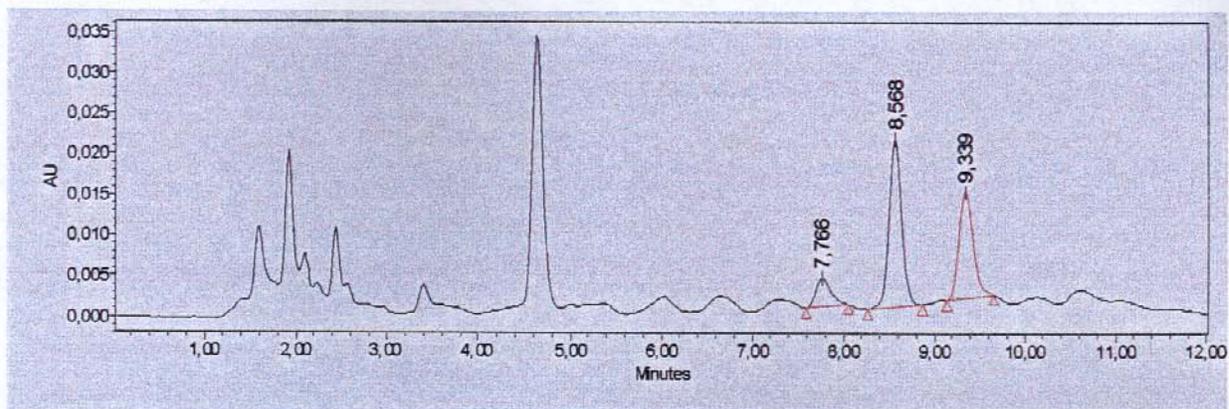


Figura 28 - Cromatograma do extrato do músculo com adição de $0,500 \mu\text{g g}^{-1}$ de OFX (t_R 7,76) e $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de CFX e EFX (t_R 8,57 e 9,34). FM tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica.

Faixa linear, linearidade e sensibilidade

Uma curva analítica, empregando-se a padronização interna e plotando-se a razão entre as áreas da EFX/OFX e CFX/OFX *versus* concentração do analito, é apresentada na Figura 29. Amostras de $1,0 \text{ g}$ de músculo foram fortificadas no intervalo de concentração de $0,200$ a $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foram submetidas, anterior análise cromatográfica, ao procedimento completo de preparo de amostra (III.3.4.1).

A equação da reta obtida para a CFX foi $y = 0,1817 + 1,284x$ e da EFX foi $y = 0,2632 + 1,089x$, onde y : razão das áreas de EFX/OFX, CFX/OFX e x : concentração da FQ em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O método mostrou-se linear no intervalo estudado, com uma linearidade de $0,9964$ e $0,9957$ para a CFX e EFX, respectivamente.

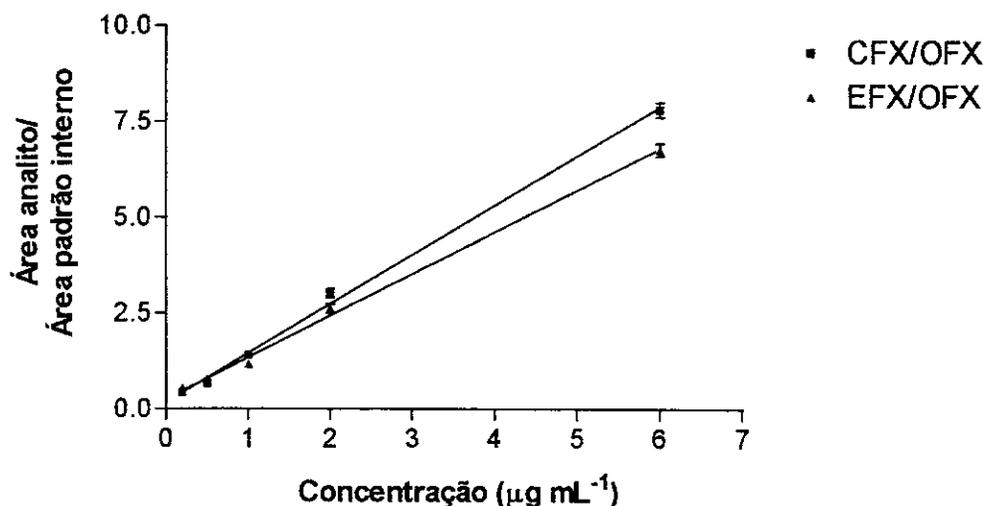


Figura 29 - Curva analítica com adição CFX e EFX ao músculo do grupo controle, empregando OFX como padrão interno.

Limites de detecção e quantificação

O LOD, calculado como a relação sinal/ruído igual a 3 e LOQ, como relação sinal/ruído igual a 10, foram de 30 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para ambos antimicrobianos. Estes valores foram confirmados com a injeção dessas concentrações no cromatógrafo à líquido, nas mesmas condições analíticas em que foi feita a curva. Estes valores são maiores que os reportados por Yorke e Froc (2000) que quantificaram 9 FQ em músculo de frango, entre elas a EFX e CFX utilizando a CLAE com detector de fluorescência, onde o LOQ determinado para a EFX e CFX foi de 7,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Horie et al. (1994) também empregaram a CLAE com detector de fluorescência para determinar EFX, entre outras FQ, em músculo de frango, tendo estabelecido um LOD de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a EFX.

A diferença nos LOD e LOQ determinados pelos autores acima mencionados e os valores estabelecidos neste trabalho é decorrente do tipo de detector empregado na cromatografia líquida, sendo que o detector de fluorescência apresenta uma maior detectabilidade para essa classe de compostos do que o detector de arranjo de fotodiodos.

Precisão

Uma curva analítica foi construída no primeiro dia de análise das amostras de músculo. A cada dia de análise dessas amostras, um ponto da curva analítica (músculo fortificado com EFX e CFX) foi injetado no cromatógrafo a líquido e verificado a percentagem de recuperação. As concentrações avaliadas foram 250, 500, 1000 e 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A precisão inter-ensaio, foi avaliada pelo RSD. A variação média ($n = 4$) dos pontos em relação à curva foi de 5 % para CFX (100 ± 5 %) e 6 % para EFX (93 ± 6 %). Foi estabelecido como critério que se a variação fosse maior que $3s/\sqrt{n}$ uma nova curva analítica seria construída. Como o valor determinado foi menor, não foi necessária a construção de uma nova curva analítica durante os dias de análise.

Garcia-Ovando et al. (2000) determinaram EFX e CFX em músculo de frango, empregando a CLAE com detector de fluorescência e encontraram valores para a precisão inter-ensaio ($n=3$) igual a 8 % em média para CFX e EFX. Yorke e Froc (2000) reportaram valores para precisão inter-ensaio menores que 13 % para os dois analitos.

Exatidão

A exatidão foi avaliada mediante teste de recuperação, em três concentrações de EFX e CFX, adicionando-se os analitos nas amostras de músculo de aves do grupo controle. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21.

As percentagens de recuperação nos três níveis de fortificação avaliados foram em média 91 e 86 % para CFX e EFX, respectivamente, e estão de acordo com os valores considerados aceitos pela Comunidade Européia (entre 80 e 110%), demonstrando exatidão do método para análise desses antimicrobianos em músculo do peito de frango. Os resultados estão de acordo com aqueles determinados por Garcia-Ovando et al. (2000), Yorke e Froc (2000) e Horie et al. (1994).

Garcia-Ovando et al. (2000) utilizaram a ELL (extração líquido líquido) com tampão fosfato e diclorometano para analisar amostras de músculo fortificadas em três níveis de concentração de EFX (3,9; 31 e 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e encontraram recuperações médias de 71, 89 e 100 % , respectivamente.

Yorke e Froc (2000) fortificaram amostras de músculo em cinco níveis de concentração diferentes e obtiveram recuperações médias de 67 e 77 % para EFX e CFX, respectivamente.

Horie et al. (1994) analisaram amostras de músculo fortificadas com 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de EFX e calcularam a recuperação média (n=5) de 82 %. A extração dos analitos da matriz foi feita com ácido metafosfórico + acetonitrila (70 + 30 v/v) e a limpeza do extrato utilizando cartuchos de SPE C₁₈, após serem testados várias marcas de cartuchos C₁₈.

Tabela 21 -Determinação de EFX e CFX adicionados ao músculo de animais do grupo controle.

Concentração adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CFX		EFX	
	Concentração Determinada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração determinada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
500	433 ± 25	87	376 ± 24	75
1000	983 ± 76	98	961 ± 95	96
3000	2634 ± 223	88	2647 ± 218	88
Média	-	91 ± 6		86 ± 10

*Valores expressos como média ± D (desvio médio, n = 2).

IV.5 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango

IV.5.1 - Preparo de amostra de fígado

O procedimento de extração foi feito conforme item III.3.5.1. Os resultados obtidos com o uso de cartuchos Narc-2, com padrão analítico (EFX e CFX 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e empregando 1,0 g de fígado fortificando com 0,500 μg de EFX e CFX, são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Recuperação de EFX e CFX em fígado, utilizando cartuchos Narc-2.

Solução aplicada ao cartucho Narc-2	Recuperação CFX	Recuperação EFX
Solução padrão diluída em 10 mL da SE*	87 ± 2%	91 ± 7%
1,0 g de amostra em 10 mL da SE*	62 ± 13%	51 ± 10%

*Valores expressos como média (n=3) ± SD (estimativa do desvio padrão). SE = solução extratora composta de ácido tricloroacético 10% + ACN (80 + 20 v/v). Procedimento B, (III.3.3.1, pág. 38).

As percentagens de recuperação, tanto da CFX como da EFX, foram menores na extração dos analitos da matriz, quando comparadas com a ausência desta. Foram construídas curvas analíticas utilizando amostras de fígado do grupo controle (branco) fortificadas com os padrões analíticos em diferentes concentrações, sendo possível determinar as concentrações dos analitos, com o método da padronização externa, sem efetuar correção dos valores.

IV.5.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em fígado de frango

A metodologia analítica foi validada com a matriz fígado, já que ao modificar a matriz diferentes interferentes podem ser detectados pela metodologia desenvolvida. Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de amostra do fígado de frango do grupo controle (branco), submetida ao processo de extração descrito em III.3.5.1. Um cromatograma do branco é apresentado na Figura 30.

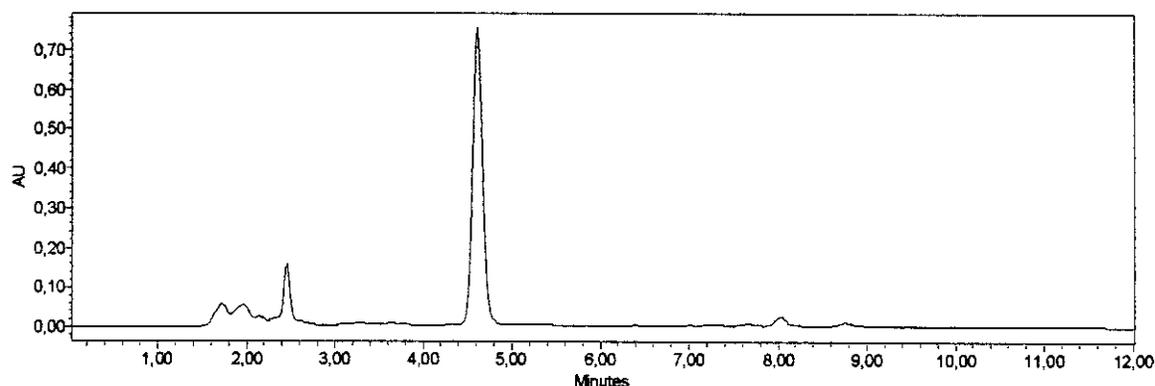


Figura 30 - Cromatograma do extrato do branco do fígado FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE C18-catiônica.

Como pode ser observado na Figura 30, além dos compostos que eluem no início do cromatograma, há interferentes eluindo na região na qual a OFX é quantificada, impedindo assim a adição do padrão interno para a quantificação de EFX e CFX em amostras de fígado. Em consequência foi empregada a padronização externa para quantificação de EFX e CFX em fígado.

Na Figura 31 é apresentado um cromatograma de uma amostra de fígado de frango do grupo controle (branco) em que foram adicionados CFX e EFX sendo depois extraídos como descrito em III.3.5.1. Observa-se que o interferente está presente no tempo de retenção da OFX, sendo quantificado pelo programa do equipamento como tal, justificando não utilizar este padrão interno na análise da matriz fígado.

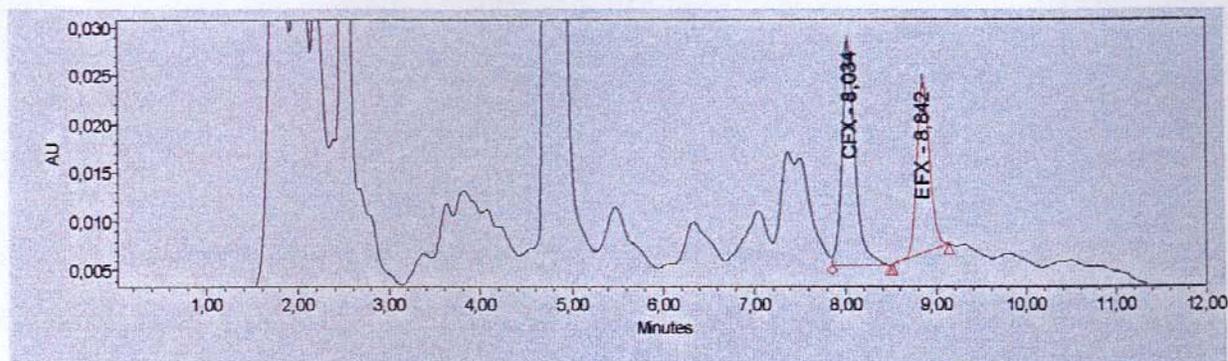


Figura 31 - Cromatograma do extrato do fígado com adição de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CFX e EFX. FM tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica.

Faixa linear, linearidade e sensibilidade

Uma curva analítica externa, plotando-se a área da EFX e CFX *versus* concentração do analito, é apresentada na Figura 32. Amostras de 1,0 g de fígado foram fortificadas no intervalo de concentração de $0,400$ a $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foram submetidas, anterior análise cromatográfica, ao procedimento completo de preparo de amostra.

A equação da reta obtida para a CFX foi $y = 81690 + 223400x$ e da EFX foi $y = -24180 + 202700x$, onde y: área da EFX e CFX e x: concentração da FQ em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O método é linear no intervalo estudado com coeficientes de correlação linear de 0,9811 e 0,9962 para a CFX e EFX, respectivamente.

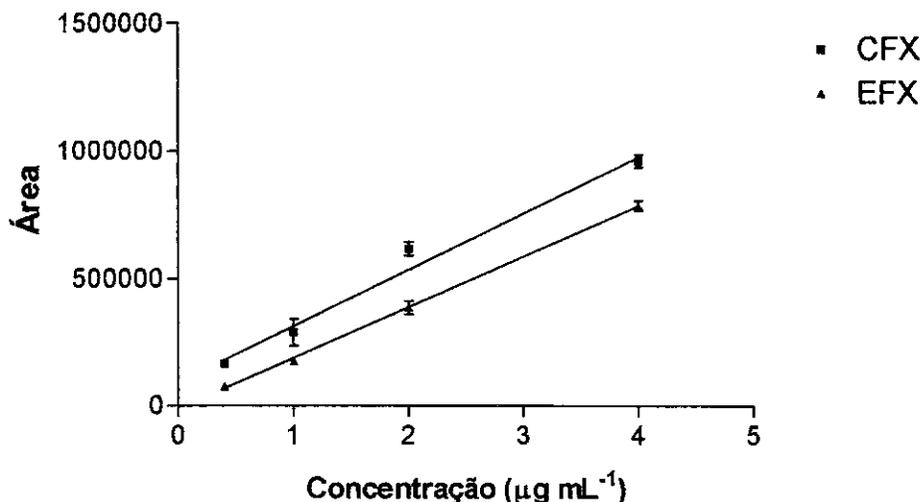


Figura 32 - Curva analítica da EFX e CFX a amostras de fígado do grupo controle.

Limites de detecção e quantificação

O LOD (relação sinal/ruído igual a 3) e LOQ (relação sinal/ruído igual a 10) para CFX e para EFX foram calculados, sendo o LOD = 60 e o LOQ = 200 µg kg⁻¹. Estes valores foram confirmados com a injeção dessas concentrações no cromatógrafo a líquido, nas mesmas condições analíticas em que foi feita a curva. O LOD determinado por Horie et al. (1994) em fígado foi de 10 µg kg⁻¹ para a EFX, porém o autor utilizou detetor de fluorescência.

Precisão

Uma curva analítica foi construída no primeiro dia de análise das amostras de músculo. A cada dia de análise dessas amostras, um ponto da curva analítica (músculo fortificado com EFX e CFX) foi injetado no cromatógrafo a líquido e verificado a percentagem de recuperação. As concentrações avaliadas foram 200, 500 e 1000 µg kg⁻¹.

A precisão inter-ensaio foi avaliada pelo RSD. A variação média (n = 3) dos pontos em relação a curva foi de 11 % para CFX (75 ± 8 %) e 9,1 % para EFX (99 ± 9 %). Não foi necessário a construção de uma nova curva analítica durante os dias

de análise, já que a variação encontrada foi menor do que a que era estabelecida como aceita de até $3s/\sqrt{n}$.

Exatidão

O teste de recuperação foi utilizado para verificar a exatidão do método. As amostras do branco da matriz foram fortificadas com três concentrações de EFX e CFX e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 -Determinação de EFX e CFX adicionados ao fígado de animais do grupo controle.

Concentração adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CFX		EFX	
	Concentração Determinada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração determinada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
500	440 \pm 48	88	463 \pm 45	93
1000	1112 \pm 269	110	1102 \pm 241	110
2000	1797 \pm 110	90	1908 \pm 169	95
Média	-	96 \pm 12	-	99 \pm 9

*Valores expressos como média \pm D (desvio médio, n=2).

Os valores determinados são melhores que os descritos por Posyniak et al. (2001) e Horie et al. (1994). As percentagens de recuperação nos três níveis de fortificação avaliados foram em média 96 e 99 % para CFX e EFX, respectivamente, demonstrando exatidão do método para análise desses antimicrobianos em fígado de frango. A estimativa do desvio médio foi maior para o fígado do que para o músculo devido a quantificação das amostras de fígado ter sido feita sem o uso do padrão interno.

Posyniak et al. (2001) estudaram o efeito da matriz e preparo da amostra na determinação de EFX e CFX em músculo e fígado de frango, empregando a CLAE com detector de fluorescência. Analisando amostras de fígado fortificadas com 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de EFX e CFX, os autores encontraram recuperação média (n = 6) de 83 e 86

%, para EFX e CFX respectivamente. Horie et al. (1994) obtiveram uma recuperação média (n=5) para fígado de 85 %.

IV.6 - Desenvolvimento e validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango

IV.6.1 - Preparo de amostra de rim

O procedimento de extração em fase sólida foi feito conforme item III.3.6.1. Os resultados obtidos com o uso de cartuchos Narc-2, com padrão analítico (EFX e CFX 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e na limpeza do extrato da matriz, com adição de 0,500 μg de EFX e CFX, são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Recuperação de CFX e EFX em rim utilizando cartuchos Narc - 2.

Solução aplicada ao cartucho Narc-2	Recuperação CFX	Recuperação EFX
Solução padrão diluída em 10 mL da SE*	87 \pm 2%	91 \pm 7%
1,0 g de amostra em 10 mL da SE*	47 \pm 7%	51 \pm 9%

*Valores expressos como média (n=3) \pm SD (estimativa do desvio padrão). SE = solução extratora composta de ácido tricloroacético 10% + ACN (80 + 20 v/v). Procedimento B (III.3.3.1, pág, 38).

A recuperação dos analitos na matriz foi próxima de 50%. É importante considerar a complexidade da matriz, que possui grande número de compostos competindo com os analitos de interesse pelos sítios ativos da fase mista do cartucho de extração.

Foi construída curva analítica fortificando amostras de rim do grupo controle, com os padrões EFX e CFX para determinar as concentrações dos analitos nas amostras, sem a necessidade de correção dos valores para 100 %.

IV.6.2 - Validação do método para a determinação de EFX e CFX em rim de frango

A metodologia analítica também foi validada para o rim, já que diferentes interferentes podem ser detectados dependendo da matriz, podendo prejudicar a detecção e quantificação dos analitos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de amostra do rim de frango do grupo controle (branco), submetida ao processo de extração (III.3.6.1). Um cromatograma do extrato é apresentado na Figura 33.

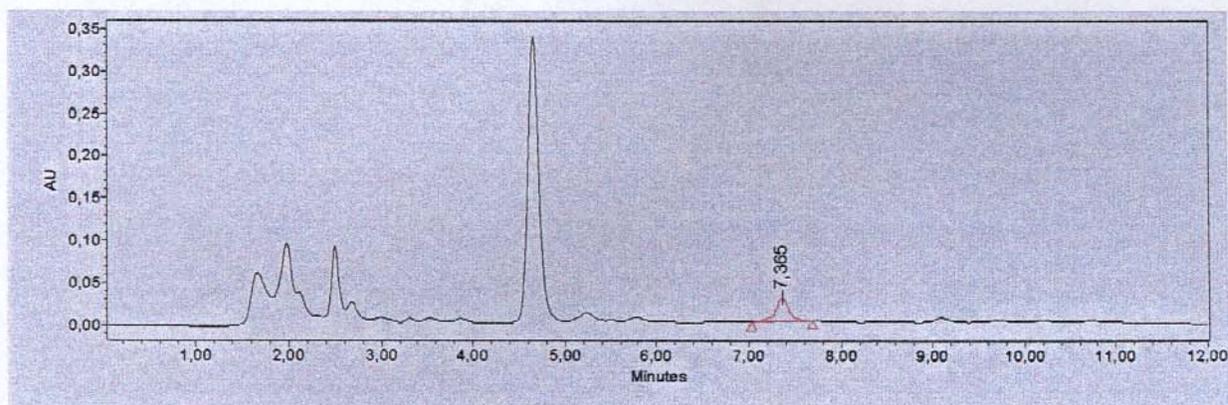


Figura 33 - Cromatograma do extrato do branco do rim. FM tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min⁻¹. FE C18-catiônica.

Há interferentes eluindo na região onde a OFX é quantificada, além dos picos que eluem no início da corrida cromatográfica, como pode ser observado na Figura 33. Isto impede a adição do padrão interno às amostras de rim. Assim o método de padronização externa foi empregado para quantificação da EFX e da CFX.

Em uma amostra de rim de frango do grupo controle (branco) foram adicionados CFX e EFX e esta foi submetida ao processo de extração descrito em III.3.6.1. O cromatograma é apresentado na Figura 34.

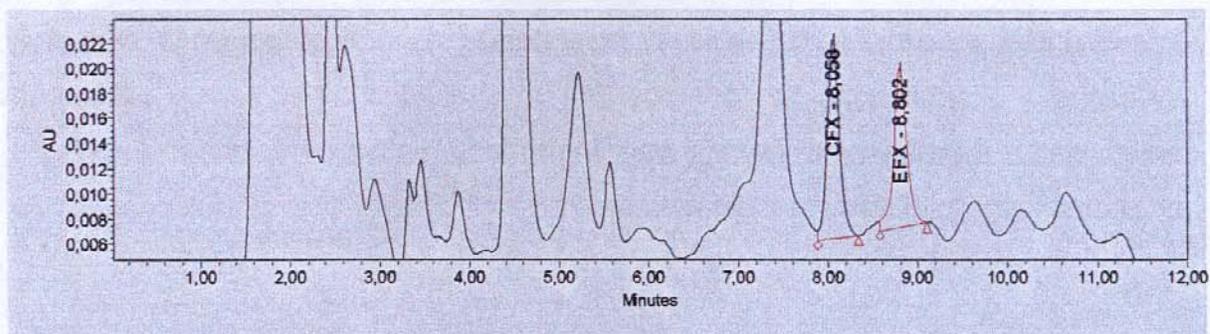


Figura 34 - Cromatograma do extrato do rim com adição de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CFX e EFX. FM tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,5)/ACN gradiente de 0 até 8 min, 90/10 v/v a 80/20 v/v e de 8 a 12 min de 80/20 v/v a 90/10 v/v, vazão 1 mL min^{-1} . FE C18-catiônica.

Faixa linear, linearidade e sensibilidade

Amostras de $1,0 \text{ g}$ de rim foram fortificadas com EFX e CFX no intervalo de concentração de $0,20$ a $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foram submetidas, anterior análise cromatográfica, ao procedimento completo de preparo de amostra. Uma curva analítica, plotando-se a área da CFX e EFX *versus* concentração do analito é apresentada na Figura 35.

A equação da reta obtida para a CFX foi $y = -10300 + 211000x$ e da EFX foi $y = 9414 + 198200x$, onde y : área da EFX e CFX e x : concentração da FQ em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O método é linear no intervalo estudado com coeficientes de correlação linear de $0,9962$ e $0,9921$ para a CFX e EFX, respectivamente.

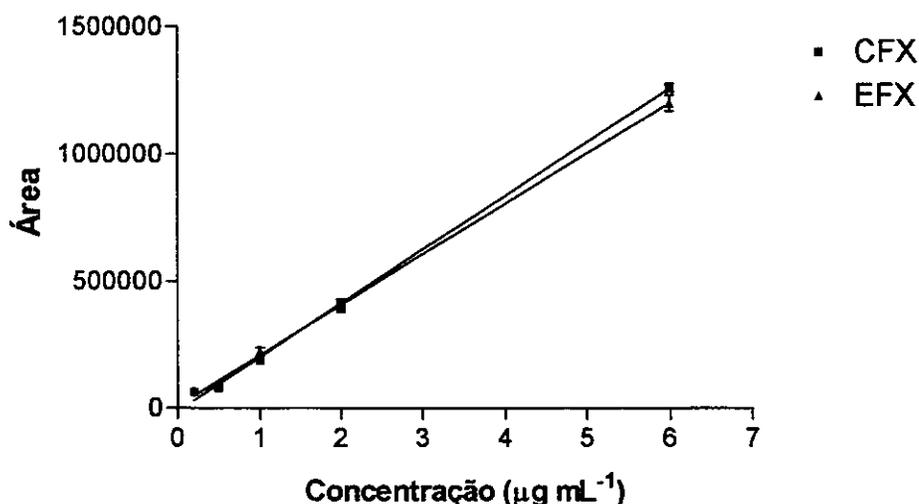


Figura 35 - Curva analítica com adição de CFX e EFX ao rim do grupo controle.

Limites de detecção e quantificação

O LOD (relação sinal/ruído igual a 3) e LOQ (relação sinal/ruído igual a 10) para CFX e para EFX foram calculados, sendo o LOD = 30 e o LOQ = 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores foram confirmados com a injeção dessas concentrações no cromatógrafo a líquido, nas mesmas condições analíticas em que foi feita a curva.

Van Vyncht et al. (2002) utilizaram a CLAE-MS para determinar EFX e CFX em fígado de suínos, com ELL dos analitos da matriz. Mediante emprego de LC-MS, os autores conseguiram obter um LOD menor que 10 para EFX e menor que 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para CFX.

Precisão

A precisão foi avaliada pela repetibilidade inter-ensaio.

Uma curva analítica foi construída no primeiro dia de análise das amostras de rim. A cada dia de análise dessas amostras, um ponto da curva analítica (rim fortificado com EFX e CFX) foi injetado no cromatógrafo a líquido e verificado a percentagem de recuperação. As concentrações avaliadas foram 250, 500 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A precisão foi avaliada pelo RSD. A variação média ($n = 3$) dos pontos em relação à curva foi de 13 % para CFX (98 ± 12 %) e 5,9 % para EFX (84 ± 5 %). Não foi necessário a construção de uma nova curva analítica durante os dias de análise, já que a variação encontrada foi menor do que a que era estabelecida como aceita de até $3s/\sqrt{n}$.

Exatidão

O teste de recuperação, fortificando as amostras do rim grupo controle, com três concentrações de EFX e CFX, estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Determinação de EFX e CFX adicionados ao rim de animais do grupo controle.

Concentração adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CFX		EFX	
	Concentração Determinada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Concentração determinada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)
500	424 ± 66	85	495 ± 90	99
1000	931 ± 81	93	925 ± 81	92
3000	2998 ± 130	100	2996 ± 256	100
Média	-	93 ± 8	-	97 ± 4

*Valores expressos como média \pm D (desvio médio, $n=2$).

Em média as percentagens de recuperação nos três níveis de fortificação avaliados foram 93 e 97 % para CFX e EFX, respectivamente, demonstrando exatidão do método para análise desses antimicrobianos em rim de frango.

Van Vyncht et al. (2002) testaram vários cartuchos e discos de EFS. Empregando a fase mista SDB - RPS, foram obtidas, com níveis de fortificação de 100 e 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$, recuperações médias de 104 e 100 % para CFX e EFX, respectivamente. Posyniak et al. (1999) extraíram as FQ com ATCA 5 %/ACN (70 + 30 v/v) e a EFS com cartucho SDB1 (estireno divinil benzeno) foi utilizada na limpeza do extrato. Analisando amostras de rim fortificadas com EFX e CFX nas

concentrações de 30 e 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os autores encontraram recuperação média de 86 e 82 % para rim de bovinos e 83 e 84 % para rim de suínos.

IV.7. - Ensaio com frangos de corte

O ensaio com os frangos da linhagem Cobb foi descrito no item III.3.7 do procedimento experimental (pág. 47). As aves do ensaio foram utilizadas para determinar o perfil farmacocinético da EFX em frangos de corte e para determinar os níveis de resíduos de EFX e seu metabólito (CFX) nos tecidos, ambos após administração oral da EFX. Os resultados são apresentados nos itens IV.7.1 e IV.7.2.

O ensaio farmacocinético e nível de resíduos foi realizado em frangos de corte da linhagem Cobb (n=7), sendo administrada EFX na dose de 10 mg/kg de p.c., por três dias consecutivos. A dose de 10 mg/kg de p.c. é a dose recomendada para frangos e o protocolo do ensaio foi baseado no trabalho de Anadón et al. (1995), que realizou estudo com frangos da linhagem Hubbard x Hubbard, com a diferença que os frangos empregados no nosso estudo foram criados desde o 1^o dia de vida com todas as condições experimentais controladas; os frangos empregados no estudo realizado por Anadón et al. (1995), foram obtidos em uma granja no 33^o dia de vida.

IV.7.1 - Ensaio farmacocinético com frangos de corte

A relação entre a administração de um fármaco, a sua biodisponibilidade (absorção), a rota de biotransformação, o tempo de sua distribuição nos órgãos e tecidos e o nível da concentração alcançada em diferentes regiões do corpo é denominada farmacocinética, ou seja, descreve o que o organismo faz com o fármaco. Por outro lado a farmacodinâmica estuda a interação do fármaco com o sítio de ação no sistema biológico (RANG et al., 2001).

Em sua maioria, os fármacos empregados na avicultura são administrados por via oral. A absorção no trato digestório depende de muitos fatores, incluindo: motilidade gastrintestinal; pH gastrintestinal; tamanho das partículas e interação físico-química com o conteúdo intestinal.

A eliminação de fármacos, que consiste na sua perda irreversível pelo corpo, ocorre pelos dois processos: biotransformação e excreção. A excreção envolve a perda do fármaco quimicamente inalterado, enquanto a biotransformação implica a conversão de um composto químico em outro (RANG et al., 2001).

Após administrar 10 mg/kg de p.c. de EFX foi construído o perfil farmacocinético da EFX para cada ave do grupo do ensaio farmacocinético (Figura 36). Foram determinadas as concentrações de EFX e de CFX nas amostras de plasma coletadas de cada ave, durante um período de 48 h. As amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca nos tempos de 0; 0,25; 0,5; 1; 2 horas e via punção na veia braquial das asas a partir dos tempos, 4; 6; 8; 12; 24 e 48 horas após administração da EFX, totalizando 11 coletas. As análises do plasma, quanto às concentrações de EFX e CFX, foram realizadas conforme o método desenvolvido e validado e descrito em IV.3.

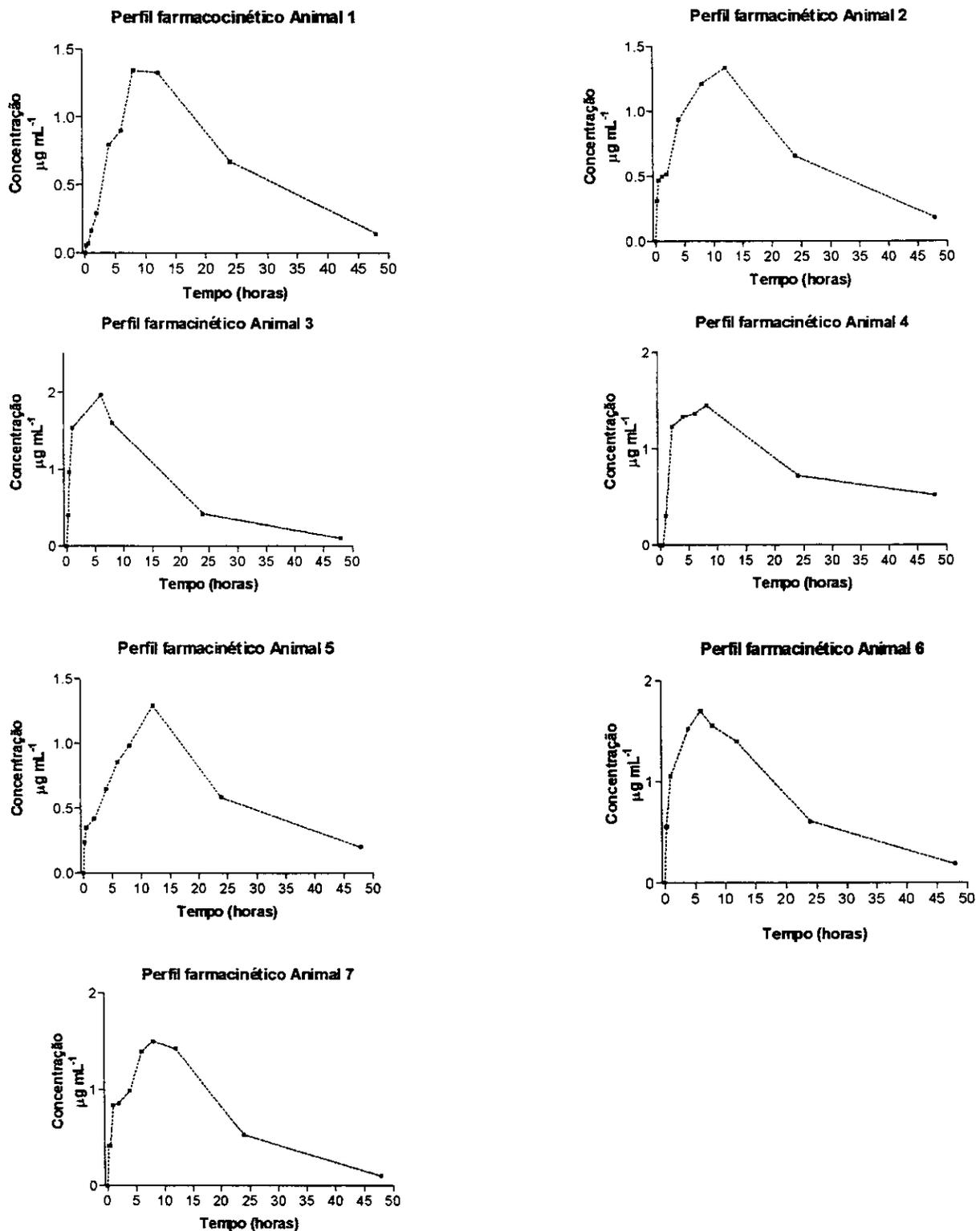


Figura 36 - Perfil farmacocinético das aves (n = 7) após administração oral de 10 mg de EFX/kg de p.c.

Quando um medicamento é administrado por via oral, a concentração plasmática irá, em geral, elevar-se na fase inicial da absorção e decair quando: (1) a absorção estiver completa; (2) o fármaco estiver no estado estável de equilíbrio dinâmico entre os compartimentos e (3) a taxa do declínio da concentração estiver na dependência dos processos de eliminação (Kalant e Roschlau, 1991). Isto pode ser observado no perfil farmacocinético médio ($n=7$ aves), apresentado na Figura 37 após administração oral da EFX.

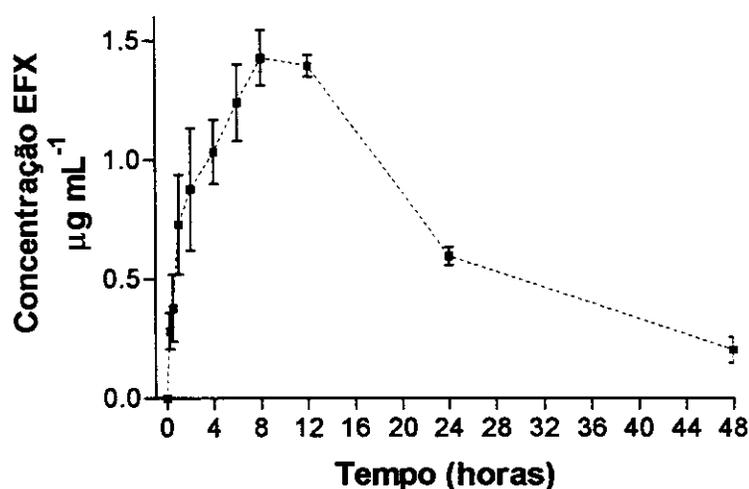


Figura 37 - Perfil farmacocinético da EFX (10 mg/kg de p.c.) após administração oral do fármaco em frangos de corte ($n=7$).

As concentrações de CFX determinadas no plasma das aves ($n=7$) ficaram abaixo do LOQ do método. Todavia, os dados indicam que o perfil farmacocinético do metabólito é semelhante aquele verificado com a EFX.

O gráfico de concentração plasmática da EFX *versus* tempo (Figura 37) sugere que a distribuição do fármaco siga um modelo de dois compartimentos, corroborando os resultados relatados por Anadón et al. (1995). O modelo de dois compartimentos admite um compartimento central que pode corresponder ao plasma, e um compartimento periférico, que inclui o espaço extracelular e, possivelmente, os tecidos receptores em equilíbrio.

Utilizando o programa Origin 6.0 foi obtida a equação que melhor se ajusta ao perfil farmacocinético descrito, que é uma equação exponencial de terceira ordem:

$$C = A_1e^{-\kappa t} + A_2e^{-\alpha t} + A_3e^{-\beta t} \quad (8)$$

onde: κ é a constante de absorção de primeira ordem, α é a constante para distribuição de fases e β é a constante de eliminação da fase terminal.

Substituindo os valores calculados pelo programa matemático para o perfil da Figura 36, tem-se que:

$$C = 7,56e^{-0,0713.t} - 5,95 e^{-0,1417.t} - 1,46e^{-0,0465.t} \quad (9)$$

Após uma dose oral única de um medicamento, obtêm-se medidas seriadas das concentrações plasmáticas do fármaco. Deste procedimento podem ser retirados três importantes parâmetros: (1) concentração plasmática máxima do fármaco; (2) tempo necessário para atingir-se a concentração plasmática máxima e (3) área sob a curva concentração-tempo (ASC). Os dois primeiros parâmetros são simples indicadores da taxa de absorção, sendo que a ASC reflete a extensão da absorção (KALANT e ROSCHLAU, 1991).

A área sobre a curva ($ASC_{0 \rightarrow t}$) da concentração plasmática *versus* o período de tempo estudado foi calculada usando a régua trapezoidal para todos os pontos da curva determinados e é igual a calculada segundo a equação descrita por Anadón et al. (1995):

$$ASC = (A_1/\kappa) + (A_2/\alpha) + (A_3/\beta) \quad (10)$$

O tempo médio de residência (TMR) da EFX foi calculado pela equação 11 (ANADÓN et al., 1995).

$$TMR = (A_1/\kappa^2 + A_2/\alpha^2 + A_3/\beta^2) \times 1/AUC \quad (11)$$

Foi construído um gráfico do log das concentrações plasmáticas *versus* tempo (Figura 38) para cada animal e utilizando a regressão linear da fase de eliminação

da curva (Figura 39) a constante de eliminação K_e foi calculada segundo recomendado por Kalant e Roschlau (1991), onde $K_e = m \cdot 2,303$, sendo $m =$ coeficiente angular da curva.

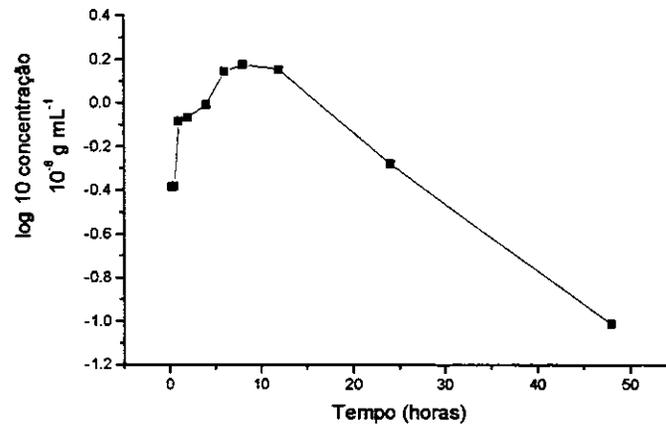


Figura 38 - Gráfico do log da concentração versus tempo.

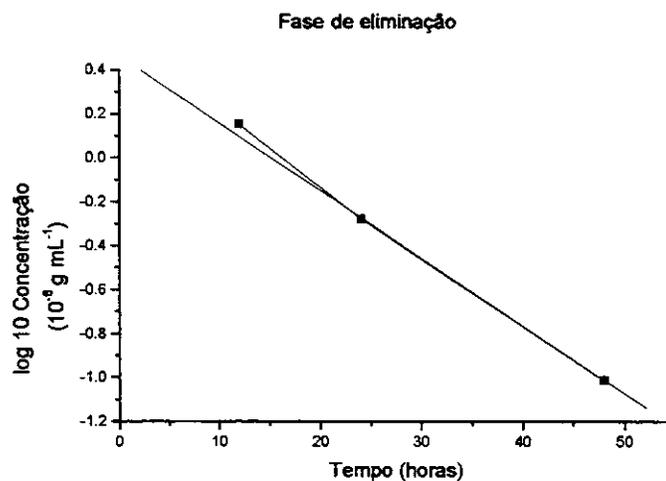


Figura 39 - Gráfico do log da concentração versus tempo da fase de eliminação da curva farmacocinética.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é o tempo necessário para alterar a quantidade do fármaco no corpo para metade durante a eliminação. O $t_{1/2}$ foi calculado de acordo com a equação utilizada por Knoll et al. (1999).

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_e \quad (12)$$

Os parâmetros farmacocinéticos médios que descrevem a disposição da EFX após administração oral do medicamento em frangos da linhagem Cobb foram calculados e estão listados na Tabela 26.

Tabela 26- Parâmetros farmacocinéticos calculados para cada animal do grupo III.

Animal	ASC _{0at} ($\mu\text{g h mL}^{-1}$)	C _{max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	t _{max} (h)	K _e (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
1	33	1,3	8,0	0,06	12
2	34	1,3	12,0	0,06	13
3	33	2,0	6,0	0,07	10
4	41	1,5	8,0	0,03	28
5	30	1,3	12,0	0,05	14
6	38	1,6	6,0	0,05	13
7	33	1,5	8,0	0,07	9
Média	35 ± 4	1,5 ± 0,2	9 ± 2	0,06 ± 0,02	14 ± 6

Sendo K_e = constante de eliminação. $K_e = m \cdot 2,303$ e $t_{1/2} = 0,693 / K_e$

Na Tabela 27 são apresentados os parâmetros farmacocinéticos determinados neste trabalho e por outros autores após administração oral da EFX em frangos em dose única de 10 mg/kg de p.c.

A concentração máxima de EFX no plasma verificada no presente estudo foi de $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, atingida após 9 horas da administração da EFX. Essa concentração foi menor que aquelas determinadas por Knoll et al. (1999), de $1,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=6, as coletas foram realizadas em animais diferentes durante o período de 24 horas) e por

Anadón et al. (1995), de $2,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=8$, coletas no mesmo animal), respectivamente (Tabela 27). Tanto, Knoll et al. (1999) como Anadón et al. (1995) realizaram o estudo farmacocinético, aplicando uma dose de EFX de 10 mg/kg de p.c., em frangos de corte da linhagem Lohmann Meat B e Hubbard x Hubbard, respectivamente.

Tabela 27 - Comparação dos parâmetros farmacocinéticos da EFX determinados e reportados na literatura para frangos de corte.

Parâmetros farmacocinéticos	Presente estudo*	Anadón et al., 1995**	Knoll et al., 1999
$C_{\text{max}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$1,5 \pm 0,2$	$2,44 \pm 0,64$	1,88
$t_{\text{max}} (\text{h})$	9 ± 2	$1,64 \pm 0,04$	1,50
$K_e (\text{h}^{-1})$	$0,06 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	0,119
$t_{1/2} (\text{h})$	14 ± 6	$14,23 \pm 0,46$	5,81
TMR	15,64	15,30	7,58
$ASC_{\text{0at}} (\mu\text{g h mL}^{-1})$	35 ± 4	$22,26 \pm 0,69$	12,48

*média \pm estimativa do desvio padrão ($n=7$); **média \pm estimativa do desvio padrão ($n=8$)

A média da ASC (Tabela 26) foi de $35 \mu\text{g h mL}^{-1}$. O valor encontrado por Anadón et al. (1995) foi de $22,26 \mu\text{g h mL}^{-1}$. Isso provavelmente se explica porque a fase de absorção da curva do presente estudo foi maior que a daqueles autores.

O TMR calculado segundo a equação (11) foi de $15,64 \text{ h}$, valor muito próximo ao calculado por Anadón et al. (1995), de $15,30 \text{ h}$.

O $t_{1/2}$ da EFX no plasma dos frangos estudados foi de 14 horas enquanto ANADÓN et al. (1995) relataram $t_{1/2}$ de $14,23 \text{ horas}$ e Knoll et al. (1999) de $5,81 \text{ horas}$. A idade dos animais do nosso estudo foram semelhantes as do estudo de Anadón et al. (seis semanas) e diferentes de Knoll et al. (três semanas) o que talvez possa justificar a diferença no tempo de meia vida ($t_{1/2}$) deste último em relação aos anteriores.

Os mesmos autores relataram um t_{max} de 1,50 h (KNOLL et al., 1999) e 1,64 h (ANADÓN et al. 1995), enquanto neste estudo foi verificado um valor de 9 h. O desvio em relação a t_{max} determinado experimentalmente foi de ± 2 h. Esse desvio relativamente elevado é decorrente do protocolo experimental utilizado, no qual as coletas foram realizadas com maior frequência durante as primeiras duas horas do ensaio, tendo em vista os valores de t_{max} reportados na literatura (ANADÓN et al., 1999). Em tempos superiores a 2 horas do início do ensaio, as coletas foram realizadas em menor frequência, sendo que a partir de 8 horas do início do ensaio, as coletas foram realizadas em 12, 24 e 48 horas após administração oral da EFX.

As diferenças quanto aos parâmetros farmacocinéticos verificados no nosso estudo e os reportados por Knoll et al. (1999) e Anadón et al. (1995) podem ser decorrentes dos seguintes fatores:

(i) Diferentes linhagens de frangos de corte empregados nos três ensaios;

(ii) Diferentes idades dos frangos empregados para o início do ensaio. Enquanto no nosso estudo a administração oral da EFX foi realizada no 40^o dia de vida, Anadón et al. (1995) e Knoll et al. (1999), realizaram o estudo com frangos no 42^o e 21^o dia, respectivamente.

(iii) Diferentes procedimentos de coleta do sangue durante o ensaio farmacocinético, induzindo níveis de estresse diferenciados. Tanto Anadón et al. (1995), como Knoll et al. (1999), realizaram as coletas na veia braquial esquerda, sendo que esses autores substituíram os animais a cada três coletas. No nosso estudo, as coletas foram realizadas inicialmente por punção cardíaca (5 coletas) e as demais na veia ulnar.

(iv) Criação dos frangos de corte, principalmente o que se refere a composição da dieta e condições de manejo. Anadón et al. (1995), utilizou no estudo frangos de corte já com 5 semanas de vida, não relatando a dieta administrada na fase inicial de crescimento das aves e se as mesmas receberam aditivos na ração durante esse período.

IV.7.2 - Ensaio para a determinação dos níveis de resíduos em músculo, fígado e rim

Em frangos, o tempo de carência que deve ser respeitado após a última administração da EFX é de sete dias. Se as aves forem abatidas antes desse período ou se o medicamento for administrado até o abate, é possível que resíduos do antimicrobiano e de seu metabólito estejam presentes nos tecidos dos animais que receberam o medicamento, assim sejam repassados à população através da dieta (ex. músculo do peito de frango). Os tecidos de fígado e rim foram analisados neste trabalho visto serem órgãos importantes de biotransformação por serem rota de metabolização e excreção da EFX e da CFX.

Foram estudados três tempos de carência: o tempo recomendado, de 7 dias, e dois períodos de tempo menores, 5 e 3 dias após a última administração da EFX, para avaliar a presença de resíduos de CFX e EFX nos tecidos destinados ao consumo humano, na situação em que o período de carência não for respeitado.

É indicado pelos fabricantes dos medicamentos onde a EFX é o princípio ativo um período de administração do medicamento de 3 dias consecutivos e nos casos de salmoneloses de 5 dias. Neste estudo o medicamento foi aplicado por 3 dias consecutivos.

Os LMR adotados pelo Brasil são os harmonizados no âmbito do Mercosul ou os recomendados pelo *Codex Alimentarius* ou a CE. No Brasil, os valores de LMR estabelecidos para EFX e CFX são aqueles adotados pela CE o qual estabeleceu LMR em tecido de frango para a soma de EFX e CFX.

Os LMR estabelecidos pela CE (EUROPEAN COMMISSION REGULATION 99/508/ECC) mostram a importância da presença destes resíduos em tecidos animais conforme seu maior consumo. O nível estipulado para o músculo do frango ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) é menor que para o fígado ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) e este por sua vez é menor que para o rim ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Para determinar os níveis de resíduos de EFX e CFX nos diferentes tecidos estudados foi empregado o método cromatográfico validado conforme itens IV.3, IV.4 e IV.5.

IV.7.2.1 - Níveis residuais de EFX e CFX no músculo do peito de frango

Resíduos de EFX e seu metabólito CFX foram determinados no músculo do peito dos frangos, que receberam o medicamento EFX por três dias consecutivos, na dose oral de 10 mg/kg de p.c.. As determinações foram realizadas em três períodos anteriores ao abate (3, 5 e 7 dias) conforme descrito em III.3.7.2 (pág. 54). Os resultados são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Concentração de EFX e CFX determinada no músculo do peito dos frangos.

Animais	7 dias carência (I) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		5 dias carência (II) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		3 dias carência (III) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	CFX	EFX	CFX	EFX	CFX	EFX
1	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	106 \pm 45
2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	94 \pm 42
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	153 \pm 60
4	<LOQ	<LOQ	ND	ND	236 \pm 14	236 \pm 10
5	<LOQ	ND	<LOQ	ND	<LOQ	89 \pm 39
6	ND	ND	ND	ND	ND	123 \pm 53
7	ND	ND	ND	ND	<LOQ	126 \pm 55
Média	-	-	-	-	-	132 \pm 50

*Valores expressos como média \pm D (desvio médio, n=2). ND - não detectada. < LOQ - O analito foi detectado, porém está abaixo do limite de quantificação (LOQ: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

A EFX foi determinada acima do limite de quantificação nas amostras de músculo proveniente das aves que receberam o medicamento por 3 dias consecutivos, finalizando o tratamento 3 dias antes do abate. A média da concentração de EFX dos sete animais foi 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A CFX foi determinada apenas no animal 4 do grupo que foi abatido com 3 dias de carência.

Verificou-se que a soma das concentrações de EFX e CFX determinadas nos animais abatidos após 3 dias da última administração do medicamento excederam o

LMR permitido pela Comunidade Européia em músculo de frango, que é de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Em trabalho semelhante, Anadón et al. (1995) administraram durante 4 dias consecutivos, dose oral de EFX, 10 mg/kg de p.c., à aves da linhagem Hubbard x hubbard. Foi feita avaliação de três períodos de carência, de 12, 6 e 1 dia anterior ao abate. A EFX e CFX foram detectadas no músculo após 24 horas da última administração, nas concentrações de 540 e 650 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Foi determinado nível de 1180 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de CFX (n=6) nos animais que se submeteram a um período de 6 dias de carência. Como esses valores encontram-se acima do LMR estabelecido pela Comunidade Européia, conclui-se que para aquela linhagem de frangos, deve ser respeitado um período de carência de 12 dias.

Segundo o fabricante do medicamento veterinário utilizado, o período de carência que deve ser respeitado até o abate deve ser de 7 dias. De acordo com os resultados encontrados, esse período de tempo é suficiente para que as concentrações do fármaco e de seu metabólito sejam menores que os LMR estabelecidos pela CE e adotados pelo Brasil. Os resultados confirmam que o desrespeito do tempo de carência pode levar a níveis de resíduos do fármaco maiores do que o LMR estabelecido no músculo do frango (carne destinada ao consumo humano), o que indica a necessidade de um trabalho de vigilância sanitária para avaliar se estão sendo adotadas as boas práticas veterinárias no uso da EFX na produção de frangos de corte.

IV.7.2.2 - Níveis residuais de EFX e CFX em fígado de frango

Resíduos de EFX e seu metabólito (CFX) foram determinados no fígado dos frangos que receberam o medicamento EFX por três dias consecutivos, na dose oral de 10 mg/kg de p.c. em diferentes períodos anteriores ao abate. Os resultados estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Concentração de EFX e CFX determinada em fígado dos animais do estudo dos níveis de resíduos.

Animais	7 dias carência (I) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		5 dias carência (II) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		3 dias carência (III) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	CFX	EFX	CFX	EFX	CFX	EFX
1	ND	<LOQ	ND	<LOQ	ND	202 \pm 43
2	ND	<LOQ	ND	<LOQ	ND	230 \pm 31
3	ND	<LOQ	ND	ND	ND	244 \pm 37
4	ND	<LOQ	ND	ND	ND	310 \pm 84
5	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	282 \pm 34
Média						254 \pm 43

*Valores expressos como média \pm D (desvio médio, n=2). ND - não detectada. < LOQ - o analito foi detectado, porém está abaixo do limite de quantificação (LOQ: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

A EFX foi detectada nas amostras de fígado após 3 dias de sua aplicação nos animais, sendo a concentração média de 260 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A presença de CFX não foi verificada acima do LOQ em nenhuma das aves dos grupos do ensaio, I, II ou III.

As concentrações de EFX, determinadas nos animais do grupo III (animais abatidos após 3 dias da última administração do medicamento), excederam o LMR permitido para a soma de EFX e CFX em fígado de frango, que é de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Quanto à amostra de fígado, no estudo realizado por Anadón et al. (1995) que também administraram dose oral de EFX de 10 mg/kg p.c. durante 4 dias consecutivos, à aves da linhagem Hubbard x Hubbard (n=6), novamente foram determinadas concentrações acima do LMR estabelecido pela Comunidade Européia. Após 24h da última administração de EFX, foi verificada a presença de 960 e 990 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de EFX e CFX, respectivamente. Respeitando 6 dias de carência, a concentração de CFX determinada foi de 1370 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a de EFX de 410 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Mais uma vez, os autores recomendam que são necessários mais de 6 dias de carência após a última administração da EFX até o abate.

IV.7.2.3 -Níveis residuais de EFX e CFX em amostras de rim de frango

Resíduos de EFX e seu metabólito, CFX, foram determinados no rim de frangos que receberam o medicamento EFX por três dias consecutivos, na dose oral de 10 mg/kg p.c., em diferentes períodos anteriores ao abate. Os resultados estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Concentração de EFX e CFX determinada em rim dos frangos de corte no estudo dos níveis de resíduos.

Animais	7 dias carência (I) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		5 dias carência (II) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		3 dias carência (III) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	CFX	EFX	CFX	EFX	CFX	EFX
1	130 \pm 10	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	140 \pm 20
2	<LOQ	ND	ND	<LOQ	120 \pm 20	150 \pm 40
3	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND	ND

*Valores expressos como média \pm D (desvio médio, n=2). ND - não detectada. < LOQ - o analito foi detectado, porém está abaixo do limite de quantificação (LOQ: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

A EFX foi determinada nas amostras de rim após 3 dias de sua aplicação em dois dos três animais do grupo III. A CFX foi determinada acima do LOQ apenas em um dos animais que receberam o medicamento 7 dias antes do abate e em um que recebeu 3 dias antes do abate. No entanto, as concentrações de CFX e EFX encontradas nos dois animais que apresentaram níveis de resíduos acima do LOQ não excederam o LMR permitido para a soma de EFX e CFX em rim de frango, que é de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

No estudo de Anadón et al. (1995), ao determinar EFX e CFX em amostras de rim dos animais que receberam, via oral, 10 mg de EFX/kg de p.c., durante 4 dias consecutivos, a concentração de CFX apresentou o maior nível de resíduos entre os tecidos estudados 3020 e 900 $\mu\text{g kg}^{-1}$ após 1 e 6 dias de carência, respectivamente. Mais uma vez, apenas os animais que foram abatidos após 12 dias da última administração do medicamento veterinário, não tiveram os níveis acima do LMR estabelecido pela Comunidade Européia.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Método analítico

◆ A cromatografia líquida de alta eficiência, com detetor de arranjo de fotodiodos, é adequada para a determinação de enrofloxacina (EFX) e ciprofloxacina (CFX) em medicamentos de uso veterinário e amostras biológicas, como plasma e tecidos de frangos.

◆ A fase estacionária octadecil pode ser empregada para a separação de EFX e CFX mediante adição de par iônico na fase móvel. O par iônico mais adequado é um composto com carga positiva, no qual prevalece um mecanismo que envolve interações eletrostáticas (repulsão) e forças de van der Waals. No entanto, a cromatografia por pares de íons compromete a repetibilidade de resultados, assim como a vida útil da coluna analítica e do sistema cromatográfico.

◆ A fase estacionária mista (octadecil + trocador de íons) é mais adequada para a separação de EFX e CFX, comparada com uma coluna de fase reversa octadecil empregando a cromatografia por pares de íons, pois não se faz necessária a adição de par iônico na fase móvel.

◆ O detetor de arranjo de fotodiodos é mais adequado para a determinação dos antimicrobianos nas amostras em comparação com o detetor UV/VIS de comprimento de onda variável, que opera em comprimento de onda fixo, em face de complexidade da matriz e da necessidade de confirmação de identidade, no entanto, possui menor detectabilidade do que o detetor de fluorescência.

◆ A metodologia analítica foi validada para determinação da EFX como princípio ativo em medicamentos de uso veterinário e mostrou-se adequada para o controle de qualidade desses medicamentos, com exatidão e precisão dos resultados.

◆ Na análise de amostras de plasma e tecidos é necessário o emprego de procedimentos de preparo de amostra, tanto para efetuar a extração do analito da

matriz, como limpeza do extrato e pré-concentração. A extração com solvente, seguida de extração em fase sólida, mostrou ser adequado. Entre os cartuchos de extração em fase sólida octadecil e de fase mista, C₁₈ com trocador iônico, o último é o mais adequado, pois apresenta melhores recuperações.

♦ Na análise de amostras de plasma e músculo foi verificado que o método de padronização interna é o mais adequado. Ainda, é recomendável que a curva analítica seja construída com a presença da matriz, ou seja, uma amostra sem os antimicrobianos deve ser fortificada com os analitos e com o padrão interno, sendo em seguida submetida ao procedimento de preparo de amostra. No entanto, cada matriz necessita ser avaliada independentemente quanto à possibilidade do emprego do padrão interno, para garantir a seletividade do método. No caso de fígado e rim um interferente da matriz co-eluiu com o padrão interno, sendo necessário a quantificação da EFX e CFX por padronização externa.

Farmacocinética

♦ No ensaio farmacocinético com frangos de corte da linhagem Cobb, no qual foi administrada uma dose oral de 10 mg de EFX/kg de peso corpóreo, foi verificado que o perfil da curva concentração plasmática versus tempo pode ser representado por um modelo de dois compartimentos, o que corrobora estudos relatados por outros autores. No entanto, o tempo no qual a concentração plasmática de EFX atingiu o máximo foi superior ao de outros estudos relatados na literatura. As diferenças quanto aos parâmetros farmacocinéticos verificados neste estudo e os reportados por outros autores podem ser decorrentes das diferentes linhagens, idade dos frangos de corte empregados nos ensaios, bem como condições de manejo e diferentes procedimentos de coleta do sangue durante o ensaio farmacocinético. Isto indica que os dados obtidos em outros países não podem ser simplesmente extrapolados, ressaltando a importância deste tipo de estudo.

Níveis de resíduos

◆ Foi verificado que não permanecem resíduos de EFX e CFX acima dos LMR estabelecidos pela Comunidade Européia nos tecidos (músculo, fígado e rim) de frangos da linhagem Cobb, quando a EFX é administrada via oral, na dose única de 10 mg/kg de peso corpóreo, por três dias consecutivos, respeitando-se o período de carência de sete dias.

◆ O período de carência recomendado pelo fabricante de sete dias é seguro, tendo em vista que nos tecidos dos frangos da linhagem Cobb não permanecem resíduos acima dos LMR estabelecidos pela CE, já que com um período de carência de cinco dias praticamente não foram encontrados níveis de resíduos de EFX acima do LMR estabelecido pela Comunidade Européia.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTREUTHER, P. Data on chemistry and toxicology of Baytril. *Veterinary Medicine Reviews*, v.2, p. 87-90, 1987.
- ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*, v.59, n.2-3, p.183-198, 1999.
- ANADÓN, A.; MARTINEZ-LARRAÑAGA, M.R.; DIAZ, M.J.; BRINGAS P.; MARTINEZ, M.A.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; FERNANDEZ, M.C.; FERNANDEZ, R. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, n.4, p.501-506, 1995.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em abril/2004.
- AVISITE. Disponível em www.avisite.com.br. Acesso em abril/2004.
- BARBOSA, J.; BARRÓN, D.; CANO, J.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; SANZ-NEBOT, V.; TORO, I. Evaluation of electrophoretic method versus chromatographic potentiometric and absorptiometric methodologies for determining pKa values of quinolones in hydroorganic mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, p.1087-1098, 2001.
- BARRÓN, D.; JIMÉNEZ-LOZANO, E.; CANO, J.; BARBOSA, J. Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v.759, p.73-79, 2001.
- BAYER. European Poultry Symposium. Leverkusen, Germany. September, 26, 1995.
- BELLAVER, C. Nutricionista frente a sustentabilidade da produção animal. In: Anais do Simpósio sobre as Implicações Sócio-Econômicas do Uso de Aditivos na Produção Animal. Piracicaba-SP, 1999. p.1-22.
- BIDLINGMEYER, B.A.; DEMING, S. N.; PRICE JR., W. P.; SACHOK B.; PETRUSEK, M. Retention mechanism for reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.186, p. 419-434, 1979.
- BRASIL, 1998a - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 193 de 12/05/98. Disponível em: www.agricultura.gov.br.

- BRASIL, 1998b - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 448 de 10/09/98. Disponível em: www.agricultura.gov.br.
- BRASIL, 1999 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 3 de 22/01/99. Disponível em: www.agricultura.gov.br.
- BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.
- BUTOLO, J.E. Aspectos econômicos dos aditivos nutricionais em animais de produção. In: Seminário - O uso adequado de antimicrobianos como aditivos melhoradores da eficiência alimentar em animais de produção. SINDAN. São Paulo-SP, 1999. p.20-36.
- CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G. GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 11, n.1, p. 1-6, 1998.
- CHEN, G. and SCHNEIDER, M. A rapid spectrofluorometric screening method for enrofloxacin in chicken muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.3249-3253, 2003.
- CHU, P.; WANG, R.; CHU, H.V. Liquid chromatographic determination of fluoroquinolones in egg albumen and egg yolk of laying hens using fluorometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.4452-4455, 2002.
- CINQUINA, A.L.; ROBERTI, P.; GIANNETTI, L.; LONGO, F.; DRAISCI, R.; FAGIOLO, A.; BRIZIOLI, N.R. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Optimization on validation. *Journal of Chromatography A*, v.987, p.221-226, 2003.
- DELEPINE, B.; HURTAUD-PESSEL, D.; SANDERS, P. Simultaneous determination of six quinolones in pig muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Analyst*, v.123, p.2743-2747, 1998.
- EUROPEAN COMMISSION DECISION 2002/657/EC, 12 August, Official Journal of the European Communities, L221/8, 2002. Implementing Council Directive 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- EUROPEAN COMMISSION REGULATION 99/508/ECC, 9 March, Official Journal of the European Communities, L60/205, 1999.
- EUROPEAN COMMISSION REGULATION 90/2377/ECC, 18 august, Official Journal of the European Communities, L224/55, 1990.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Summary of JECFA evaluations of veterinary drug residues from the 32nd meeting to the present. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/W8338E/w8338e00.htm>. Acesso em dezembro de 2001.
- FDA – Food and Drug Administration. Additional day added to meeting on establishing regulatory thresholds on antimicrobial resistance. FDA VETERINARIAN, v.XVI, n.1, January/February, 2001.
- GARCIA, M.A.; SOLANS, C.; HERNADEZ, E.; PUIG, M.; BREGANTE, M.A. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in chicken tissues. *Chromatographia*, v.54, n.3/4, p.191-194, 2001.
- GARCIA-OVANDO,H.; GORLA, N.; WEYERS, A.; UGNIA, L; MARTINEZ, N.; GIACOMELLI, R.; LISBOA, R.; CHIOSTRI, E.; DAVICINO, R. Enrofloxacin in liquid-liquid extraction from chicken muscle and HPLC detection. *Journal of Liquid and Related Technology*, v.23, n.15, p.2391-2397, 2000.
- GARCIA-OVANDO,H.; GORLA, N.; LUDERS, C.; POLONI,G.; ERRECALDE, C.; PRIETO, G.; PUELLES, I. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Journal of Veterinarian and Pharmacology Therapeutics*. v.22, p.209-212, 1999.
- GIGOSOS, P.G.; REVESADO, P.R.; CADAHÍA, O.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*, v.871, p.31-36, 2000.
- GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L.; WEYERS A.; GIACOMELLI, N.; DAVICINO, R.; OVANDO, H.G. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.8, p.253-256, 1997.
- HERNANDEZ-ARTESEROS, J.A.; BORONAT, I.; COMPAÑÓ, R.; PRAT, M.D. Liquid Chromatographic separation of fluoroquinolone antibacterials used as veterinary drugs. *Chromatographia*, v.52, n.5/6, p.295-300, 2000.
- HORIE, M.; SAITO, K.; NOSE, N.; NAKAZAWA, H. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.653, p.69-76, 1994.
- HORMAZABAL, V.; ROGSTAD, A.; STEFFENAK, I.; YNDESTAD, M. Rapid assay for monitoring residues of enrofloxacin and sarafloxacin in fish tissues by high performance liquid chromatography. *Journal Liquid Chromatography*, v.14, n.8, p.1605-1614, 1991.
- HORVÁTH, C. *High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives*, vol. 1, 330p, 1980.

- INTORRE, L.; CECCHINI, S.; BERTINI, S.; VARRIALE, A.M.C.; SOLDANI, G.; MENGOZZI, G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, v.182, p.49-59, 2000.
- JOHNSTON, L.; MACKAY, L.; CROF, M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v.982, p.97-109, 2002.
- KALANT, H. and ROSCHLAU, W.H.E. *Princípios de farmacologia médica*. 5ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1991, 687p.
- KATZUNG, B.G. *Farmacologia - Básica e clínica*. 6ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, 1995, 854p.
- KNOLL, U.; GLUNDER, G.; KIETZMANN, M. Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. n. 22, p. 239-246, 1999.
- LESHER, G.Y.; FROELICK, E.D.; GRUET, M.D.; BAILEY, J.H.; BRUDAGE, R.P.; BAILEY J.H. 1,8-naphthyridine derivatives - a new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, v.5, n.5, p.1063, 1962.
- LEWBART, G.; VADEN, S.; DEEN, J.; MANAUGH, C.; WHITT, D.; DOI, A.; SMITH, T.; FLAMMER, K. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brechypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. *Journal of Veterinarian and Pharmacology Therapeutics*. v.20, p.124-128, 1997.
- MANCEAU, J.; GICQUEL, M.; LAURENTIE, M.; SANDERS, P. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *Journal of Chromatography B*, v.726, p.175-184, 1999.
- MARASCHIELLO, C.; CUSIDÓ, E.; ABELLÁN, M.; VILAGELIU, J. Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. *Journal of Chromatography B*, v.754, p.311-318, 2001.
- MERCK INDEX - *The Merck Index*. 11th Edition, Merck & CO., Rahway, New Jersey, EUA, 1989.
- MEYER, V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, 1996.
- MILTENBURG, G. Promotores e aditivos de crescimento em avicultura. In: Simpósio Internacional sobre aditivos, saúde intestinal e qualidade de produtos avícolas. Conferência APINCO 2000 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas - SP. 23 a 25/05/2000. vol. 2, p.205-215.

- MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection*, v.61, n.6, p.742-756, 1998.
- NANGIA, A.; LAM, F.; HUNG, C. Reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of fluoroquinolones in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.79, n.11, p.988-991, 1990.
- NAVALÓN, A.; BLANC, R.; REYES, L.; NAVAS, N.; VÍLCHEZ, J.L. Determination of antibacterial enrofloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, v.454, p.83-91, 2002.
- PALERMO NETO, J. O uso adequado de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal: aspectos de farmacocinética e de toxicologia; possíveis impactos na qualidade da proteína de origem animal. In: Seminário - O uso adequado de antimicrobianos como aditivos melhoradores da eficiência alimentar em animais de produção. SINDAN. São Paulo-SP, p.20-36, 1999.
- POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; SEMENIUK, S. Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues. *Journal of Chromatography A*, v.914, p.89-94, 2001.
- POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; SEMENIUK, S.; NIEDZIELSKA, J.; ELLIS, R. Determination of fluoroquinolones residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, v.13, p.279-285, 1999.
- RAGAB, G.H. and AMIN, A.S. Atomic absorption spectroscopic, conductometric and colorimetric methods for determination of fluoroquinolone antibiotics using ammonium reineckate ion-pair complex formation. *Spectrochimica Acta Part A*, v.60, n. 4, p.973-978, 2003.
- RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCIA, E.; REUVERS, T.; HOOGHUIS, H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v. 789, p.373-381, 2003.
- RANG, H.P.; DALE; M.M.; RITTOR, J. M. *Farmacologia*. 4ª Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara-Koogan, 2001, 703p.
- RAO. G.S.; RAMESH, S.; AHMAD, A.H.; TRIATHI, H.C.; SHARMA, L.D. ; MALIK, J.K. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goats given enrofloxacin alone and in combination with probenecid. *The Veterinary Journal*, v.163, p.85-93, 2002a.
- RAO. G.S.; RAMESH, S.; AHMAD, A.H.; TRIPATHI, H.C.; SHARMA, L.D. ; MALIK, J.K. Disposition kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin following intravenous administration of enrofloxacin in goats. *Small Ruminant Research*, v.44, p.9-15, 2002b.

- RIZK, M.; BELAL, F.; IBRAHIM, F.; AHMED, S.; EL-ENANY, N.M. Voltammetric analysis of certain 4-quinolones in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, p.211-218, 2000.
- ROSE, M.D.; BYGRAVE, J.; STUBBINGS, W.F. Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food. *Analyst*, v.123, p.2789-2796, 1998.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; FERREIRA, A.S.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. UFV, Viçosa, 2000, 141p.
- ROYBAL, J.E.; PFENNING, A.P.; TURNIPSEED, S.B.; WALKER, C.C.; HURLBUT, J.A. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, v.80, n.5, p.982-987, 1997.
- SCHNEIDER, M.J.; DONOGHUE, D.J. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.780, p.83-92, 2002.
- SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p.57-66, 2003.
- SCHEER, M. Studies on the antibacterial activity of Baytril. *Veterinary Medical Review*, v.2, p.104-118, 1987.
- SNYDER, L.R. and KIRKLAND, J.J. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- STRELEVITZ, T.J.; LINHARES, M.C. Simultaneous determination of danofloxacin and N-desmethyldanofloxacin in cattle and chicken edible tissues by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, v.675, p.243-250, 1996.
- TARBIN, J.A.; TYLER, D.J.; SHEARER, G. Analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography following cation exchange clean-up. *Food Additives and Contaminants*, v.9, n.4, p.345-350, 1992.
- TURIEL, E.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A.R. Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, v.1008, p.145-155, 2003.
- TYCZKOWSKA, K.L.; VOYKSNER, R.D.; ANDERSON, K.L.; PAPICH, M.G. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite

ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.658, p.341-348, 1994.

USP XXV. United States Pharmacopeia, 25th ed. - The National Formulary, Webcom Limited, Toronto, 2002.

van VYNCHT, G.; JÀNOSI, A.; BORDIN, G.; TOUSSAINT, B.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; De PAUW, E.; RODRIGUEZ, A.R. Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.952, p.121-129, 2002.

WHO, World Health Organization. *Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health*. Report of a WHO Meeting - Emerging and Other Communicable Diseases, Surveillance and Control. Geneva, Switzerland, June/1998.

YORKE, J.C.; FROC, P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v.882, p.63-77, 2000.