

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Vanessa Gass da Silveira

**ESTUDO DE DEPLEÇÃO DE FLUORQUINOLONAS E
TETRACICLINAS EM FRANGOS DE CORTE EMPREGANDO
LC-MS/MS**

Santa Maria, RS
2016

Vanessa Gass da Silveira

**ESTUDO DE DEPLEÇÃO DE FLUORQUINOLONAS E TETRACICLINAS EM
FRANGOS DE CORTE EMPREGANDO LC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silveira, Vanessa Gass da
Estudo de depleção de fluorquinolonas e tetraciclinas em frangos de corte empregando LC-MS/MS / Vanessa Gass da Silveira.-2016.
122 f.; 30cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. Antibióticos 2. Resíduos 3. Validação de metodologia
4. Período de carência 5. Limites máximos de resíduos I. Mallmann, Carlos Augusto II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Vanessa Gass da Silveira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: vanessagsilveira@yahoo.com.br

Vanessa Gass da Silveira


**ESTUDO DE DEPLEÇÃO DE FLUORQUINOLONAS E TETRACICLINAS EM
FRANGOS DE CORTE EMPREGANDO LC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

Aprovado em 11 de março de 2016:


Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Carlos Alberto Araújo de Almeida, Dr. (UFSM)


Fabiano Barreto, Dr. (LANAGRO/RS)


Rochele Cassanta Rossi, Dr^a. (UNISINOS)


Rosselei Caiél da Silva, Dr^a. (URI/FW)

Santa Maria, RS
2016

Dedico este trabalho aos meus avós maternos, Arthur Gass (in memoriam) e Acilda Amália Gass (in memoriam), e aos meus pais, Ivaci e Clair, que sempre apoiaram e incentivaram minhas decisões, ensinando-me, desde a infância, valores essenciais como honestidade e perseverança. Vocês sempre serão a razão para que eu continue em frente!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de aprender a cada dia.

Aos meus pais, Ivaci e Clair, e meus irmãos, Simone e Giancarlo, pelo apoio em todos os momentos dessa minha jornada. Muito obrigada pelo amor de vocês, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e acreditando em mim.

Aos professores Dr. Carlos Augusto Mallmann e Dr. Paulo Dilkin, pela oportunidade de realização do meu trabalho, pelo aprendizado e voto de confiança.

Ao Dr. Fabiano Barreto, pela participação na banca examinadora e por todos os ensinamentos e auxílio em diversas etapas do meu trabalho. Agradeço também aos demais colaboradores do LANAGRO/RS, em especial à Louise Jank, pela valiosa ajuda na etapa de validação do método.

Às colegas e examinadoras da banca Dr^a Rochele Cassanta Rossi e Dr^a Rosselei Caiél da Silva, pela amizade desde a faculdade e pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Ao Dr. Carlos Alberto de Almeida, pela amizade, suporte e apoio, principalmente na etapa final do trabalho. Muito obrigada também pelas contribuições como examinador da banca.

A todos os colegas do Laboratório de Análises Micotoxicológicas, pelo auxílio na realização dos experimentos e por tornarem meus dias mais alegres. Agradeço, em especial, aos colegas Jane Foliatti Scheid, Juliano Vidal, Diogo Liberalesso, Ricardo Vargas, Luiza Pasa, Raquel Coelho, Christian Piterini, Bruna Mallmann e Adriano Mallmann, pela colaboração na execução do trabalho. Às colegas Cristiana Rosa e Raquel Santos, pelas risadas, conversas no café e, acima de tudo, pela amizade. Ao Maurício Schneider Oliveira, meu sincero agradecimento por todos os ensinamentos, orientação do meu trabalho e parceria.

Aos amigos do Instituto SAMITEC, especialmente, Leandro Giacomini, Diego Sturza, Diego Mallmann, André Mallmann, Larissa Pas, Letícia Giacomini e Tales Giacomini, pela ajuda nos experimentos.

Ao Dr. Jean-Denis Bailly e ao Dr. Olivier Puel, pela oportunidade e grande apoio na realização do estágio de doutorado sanduíche em Toulouse. Aos colegas e grandes amigos conquistados neste período incrível da minha vida, em especial, Brankica Aleksic, Yann Adjovi, Soraya Zaboub, Joya Makhlouf, Stephanie Saade Salameh, Sylviane Bailly, Arlette Querin e Marie-Rose Trumel. *Merci beaucoup!!*

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de poder fazer parte de seu corpo discente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo período de estudo.

Muito obrigada!

RESUMO

ESTUDO DE DEPLEÇÃO DE FLUORQUINOLONAS E TETRACICLINAS EM FRANGOS DE CORTE EMPREGANDO LC-MS/MS

AUTORA: Vanessa Gass da Silveira
ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Dentro da cadeia produtiva de frangos de corte, antibióticos têm sido empregados no tratamento profilático e terapêutico, visando melhorar o desempenho zootécnico dos animais. Porém, o uso indiscriminado desses fármacos pode acarretar a presença de resíduos na carne e, assim, representar riscos à saúde do consumidor. Fluorquinolonas e tetraciclina são duas classes de antibióticos amplamente utilizadas na avicultura. Para tanto, neste trabalho, desenvolveu-se e validou-se uma metodologia analítica baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), a fim de analisar resíduos de 7 antibióticos das classes citadas, em músculo de frangos. Além disso, foram realizados estudos de depleção destes fármacos em frangos de corte, a fim de quantificar os resíduos na carne. Os resultados encontrados foram comparados com os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pelas legislações brasileira e internacionais. Como método de extração, utilizou-se um procedimento com acetonitrila acidificada e purificação por centrifugação e precipitação a baixa temperatura, sem a necessidade de utilização da etapa de extração em fase sólida (SPE). O método foi validado de acordo com a diretiva 2002/657/CE da União Europeia, avaliando parâmetros de seletividade, linearidade, especificidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, efeito matriz, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), robustez e aplicabilidade do método. Para os estudos de depleção, foram administrados, oralmente, clortetraciclina (CTC), doxiciclina (DOX) e oxitetraciclina (OTC) durante 5 dias consecutivos e ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENR) e norfloxacina (NOR) por 3 dias. Após 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h da última dose administrada, foram coletadas amostras de músculo (peito) de 4 animais de cada grupo tratado e 2 do grupo controle, a fim de avaliar a concentração residual dos fármacos. O método validado apresentou-se dentro dos valores aceitáveis pela diretiva 2002/657/CE. Das 65 amostras de músculo de frango avaliadas para parâmetro de aplicabilidade, 3 apresentaram resíduos de ENR. No estudo de depleção das tetraciclina, considerando as legislações brasileira e europeia, os resultados mostraram que foram encontrados resíduos abaixo dos LMRs após 1 dia para CTC e 3 dias para DOX. Para OTC, este período foi de 2 e 3 dias, respectivamente, de acordo com as legislações brasileira e europeia. Segundo a legislação japonesa, períodos de carência de 1, 5 e 2 dias, respectivamente, para CTC, DOX e OTC seriam necessários. No estudo das fluorquinolonas, foi possível detectar traços de ENR até 9 dias após o fim do tratamento, o que inviabilizaria a exportação desta carne para Estados Unidos e Canadá. Após 1 dia da última dose administrada, os resíduos de CIP ficaram abaixo do LMR estabelecido pelas legislações brasileira, europeia e japonesa e, após 4 dias, para Estados Unidos e Canadá. No caso da NOR, o período de carência seria de 1 dia para todos os países citados. Os resultados deste trabalho colaboram com a busca da inocuidade dos alimentos para os consumidores, bem como para a utilização de métodos analíticos capazes de serem aplicados na determinação de medicamentos a comporem estudos de depleção residual em frangos de corte.

Palavras-chave: Antibióticos. Resíduos. Validação de metodologia. Período de carência. Limites máximos de resíduos.

ABSTRACT

DEPLETION STUDY OF FLUOROQUINOLONES AND TETRACYCLINES IN BROILER CHICKENS USING LC-MS/MS

AUTHOR: Vanessa Gass da Silveira
ADVISER: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Antibiotics have been widely used for prophylactic and therapeutic treatment within the broiler supply chain in order to improve animal production performance. The indiscriminate use of these drugs can, however, lead to the presence of residues in the meat and thus be a risk to the health of consumers. Fluoroquinolones and tetracyclines are two antibiotic classes that are commonly used in poultry. In this study, a liquid chromatography-based analytical method coupled with mass spectrometry was developed and validated in order to analyze residues of 7 antibiotics from the aforementioned classes in chicken muscle. Furthermore, antibiotic depletion studies were performed in broiler chickens in order to quantify the residues in the meat. The results were compared to maximum residue limits (MRLs) established by Brazilian and international laws. A procedure that employs acidified acetonitrile and purification by centrifugation and low temperature precipitation was used as the extraction method, with no need to perform a solid phase extraction (SPE) step. The method was validated in accordance with the Directive 2002/657/EC from the European Union by assessing selectivity, linearity and specificity parameters, detection and quantification limits, accuracy, precision, matrix effect, decision limit ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$), robustness and applicability of the technique. For depletion studies, chlortetracycline (CTC), doxycycline (DOX) and oxytetracycline (OTC) were administered orally for 5 consecutive days and ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR) and norfloxacin (NOR) for 3 days. After 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 and 240 h after the last dose, muscle samples (chest) were collected from 4 animals from each treated group and from 2 from the control group in order to assess the residual concentration of the drugs. The validated method presented values within acceptable parameters according to Directive 2002/657/EC. From 65 chicken muscle samples evaluated for the applicability parameter, 3 presented residues of ENR. In the tetracyclines depletion studies, results showed that residues were under the MRLs considering Brazilian and European laws after 1 day for CTC and after 3 days for DOX. For OCT, this period was of 2 and 3 days according to Brazilian and European laws respectively. According to Japanese law, withdrawal time of 1, 5 and 2 days would be needed for CTC, DOX and OCT respectively. In the fluoroquinolones study, it was possible to detect traces of ENR even 9 days after treatment, which would make the export of meat to the United States and Canada infeasible. After 1 day at the last dose administered, CIP residues were under MRLs established by Brazilian, European and Japanese laws, and after 4 days they were under limits determined by the United States and Canada. In the case of NOR, the withdrawal time would be of 1 day for all countries mentioned here. The results presented cooperate with the pursuit of food safety to consumers, as well as with the employment of analytical methods capable of determining drugs to comprise residue depletion studies in broilers.

Keywords: Antibiotics. Residues. Method validation. Withdrawal time. Maximum residue limits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Fórmula estrutural da tetraciclina26

CAPÍTULO I

Figura 1 – Multiple Reaction Monitoring chromatograms for 7 antibiotics muscle blank sample (1) and blank sample spiked with 7 analytes at MRL level (2)..... 60

Figura 2 – Extracted ion chromatogram for muscle samples spiked in MRL concentration level for fluoroquinolones..... 61

Figura 3 – Extracted ion chromatogram for muscle samples spiked in MRL concentration level for tetracyclines..... 62

Figura 4 – LC–MS/MS chromatograms for positive samples of enrofloxacin at 45.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (A), 20.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B) and 15.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (C)..... 63

CAPÍTULO II

Figura 1 – Mean of concentrations of chlortetracycline (A), doxycycline (B) and oxytetracycline (C) in chicken muscle samples. Data represent mean \pm SD values for 4 broiler chickens. 85

CAPÍTULO III

Figura 1 – Mean of concentrations of ciprofloxacin (A), enrofloxacin plus ciprofloxacin (B) and norfloxacin (C) in chicken muscle samples. Data represent mean \pm SD values for 4 broiler chickens..... 105

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Faixas de aceitação dos valores de recuperação para a exatidão do método.....30

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Mass spectrometry conditions and retention times for selected compounds.....57

Tabela 2 – MRL, LOD, LOQ, CC α and CC β values obtained for the studied analytes.58

Tabela 3 – Nominal conditions and variations for muscle samples evaluated in Youden design.....58

Tabela 4 – Precision and accuracy of antibacterials in poultry muscle.....59

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Mass spectrometry conditions and retention times for selected compounds.....83

Tabela 2 – Muscle concentration of chlortetracycline (CTC), doxycycline (DOX) and oxytetracycline (OTC) for broiler chickens treated orally with each these drugs at the rate of 60, 20 and 60 mg kg⁻¹ body weight, respectively, for five consecutive days^a.....84

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Mass spectrometry conditions and retention times for selected compounds.....103

Tabela 2 – Muscle concentration of ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (plus its metabolite ciprofloxacin) (ENR + CIP) and norfloxacin (NOR) for broiler chickens treated orally with each these drugs at the rate of 10, 10 and 15 mg kg⁻¹ body weight, respectively, for 3 consecutive days^a.....104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCRC	Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes
CC α	Limite de decisão
CC β	Capacidade de detecção
CIP	Ciprofloxacina
CTC	Clortetraciclina
DEM	Demeclociclina
DFIP	Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários
DOX	Doxiciclina
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês <i>European Medicines Agency</i>
ENR	Enrofloxacin
ENR_d5	Enrofloxacin_d5
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	Food and Drug Administration
FQ	Fluorquinolona
FQs	Fluorquinolonas
GT	Grupo de Trabalho
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
JECFA	Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares, do inglês <i>Joint Expert Committee of Food Additives</i>
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
m/z	Relação massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
NOR	Norfloxacin
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTC	Oxitetraciclina
PAMVet	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
PNCRB	Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento e Controle de Resistência Microbiana em Alimentos de Origem Animal Expostos ao Consumo

r ²	Coeficiente de Regressão
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
TC	Tetraciclina
TCs	Tetraciclinas
UE	União Europeia
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
v/v	Volume por volume
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	AVICULTURA	17
2.2	MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	18
2.2.1	Fluorquinolonas e tetraciclinas	19
2.3	LEGISLAÇÃO PARA USO DE ANTIBIÓTICOS EM ANIMAIS	22
2.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS	24
2.5	PREPARO DE AMOSTRA	25
2.6	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	27
2.6.1	Especificidade e Seletividade	28
2.6.2	Linearidade e curva analítica	28
2.6.3	Limite de detecção (LOD)	29
2.6.4	Limite de quantificação (LOQ)	29
2.6.5	Exatidão	29
2.6.6	Precisão	30
2.6.7	Limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ)	30
2.6.8	Efeito matriz	31
2.6.9	Robustez	31
2.7	ESTUDO DE DEPLEÇÃO	32
3	CAPÍTULO I	33
3.1	ARTIGO 1	33
	Abstract.....	34
	1. Introduction.....	36
	2. Material and methods	37
	3. Validation procedure	40
	4. Results and discussion	42
	5. Conclusions.....	46
	References.....	47
4	CAPÍTULO II	64
4.1	ARTIGO 2	64
	Abstract.....	65
	1. Introduction.....	66
	2. Material and methods	67
	3. Results and discussion	71
	4. Conclusions.....	74
	References.....	75
5	CAPÍTULO III	86
5.1	ARTIGO 3	86
	Abstract.....	87
	1. Introduction.....	88
	2. Material and methods	90
	3. Results and discussion	93
	4. Conclusions.....	96
	References.....	96

6	DISCUSSÃO	106
7	CONCLUSÕES.....	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
	ANEXO.....	122
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM.	122

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos enviados para publicação nas revistas científicas: *Talanta* e *Food Control*, disponíveis nos capítulos I, II e III. A discussão traz um apanhado destes artigos, com suas interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e os resultados obtidos nos artigos que compuseram as bases científicas desta tese. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO DE LITERATURA** desta tese.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira vem se destacando nas últimas décadas, devido a incrementos tecnológicos impulsionados pela articulação entre os diferentes agentes da cadeia produtiva. Com isso, o Brasil tem estado em posição de destaque no cenário mundial, ocupando o terceiro lugar na produção da carne de frango e a primeira posição nas exportações (ABPA, 2015).

O cenário mundial atual da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido. Com o objetivo de melhorar a saúde e o desempenho dos animais destinados ao consumo humano, desde 1950, um grande número de medicamentos veterinários vem sendo utilizado (BOUSOVA et al., 2013; ITO et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2012; PASCHOAL; RATH, 2008). O objetivo desta demanda está relacionado à utilização dos medicamentos tanto no tratamento de doenças infecciosas - com o objetivo de melhorar a saúde dos animais destinados ao consumo humano - quanto na forma de suplementos alimentares, agindo como promotores de crescimento. Entretanto, o uso abusivo de tais substâncias na criação destes animais pode conduzir à presença destes compostos nos alimentos, causar resistência bacteriana e efeitos adversos à saúde humana (BLATT; MIRANDA, 2005; SPINOSA et al., 2011).

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública, atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estudos realizados têm mostrado alta resistência de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isoladas de frangos frente às tetraciclina (TCs) (CAMPOS et al., 2013; DE JONG et al., 2009). Fluorquinolonas (FQs) já estiveram entre os antimicrobianos de eleição para tratamento de campilobacteriose humana. Porém, desde a década de 1990, tem ocorrido um aumento preocupante na prevalência de *Campylobacter* spp. isoladas de humanos e frangos resistentes a FQs. Estudos têm correlacionado este fato com o uso desta classe de antimicrobiano na avicultura (PIDDOCK et al., 2003; RONALD; DONALD, 2003).

Dessa forma, o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos é de grande importância e visa, principalmente, a proteção da saúde do consumidor. Para tanto, importantes órgãos como *Codex Alimentarius*, Comunidade Europeia, *Food and Drug Administration* (FDA) e outros, têm estabelecido Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para medicamentos veterinários em produtos de origem animal (ANVISA, 2015). Na

União Europeia (UE), por exemplo, desde janeiro de 2006 foi banido o uso de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento na produção animal, sendo permitido o uso de antibióticos e quimioterápicos apenas com finalidade terapêutica (SANTANA et al., 2011) O Brasil, através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), tem publicado, anualmente, instruções normativas referentes aos fármacos a serem pesquisados e seus respectivos LMRs, além dos resultados obtidos (BRASIL, 2015).

Porém, para garantir a exigência de qualidade e a segurança dos alimentos para os consumidores, métodos analíticos sensíveis e seletivos, capazes de quantificar medicamentos veterinários com os níveis exigidos são obrigatórios. Em outras palavras, técnicas analíticas com alta sensibilidade e especificidade devem estar disponíveis (LOPES et al., 2013).

Nas últimas décadas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tornou-se uma técnica essencial para laboratórios de análise de alimentos. Com isso, conseguiu-se unir alta seletividade e eficiência na separação com a obtenção de informação estrutural, massa molecular e aumento adicional da seletividade. A utilização do modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas - *Multiple Reaction Monitoring*) possibilita a análise de fragmentos de vários íons produto provenientes de um ou mais íons precursores (CHIAOCHAN et al., 2010; CHIARADIA et al., 2008; LOPES et al., 2012).

Considerando a importância do agronegócio para a economia brasileira, os objetivos do presente trabalho foram: (a) desenvolver e validar uma metodologia analítica baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS), a fim de analisar resíduos de sete antibióticos (enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina e tetraciclina) em músculo de frangos de corte; (b) realizar estudos de depleção desses fármacos em frangos de corte, a fim de verificar os resíduos em músculo e comparar a concentração encontrada com os LMRs estabelecidos pelas legislações nacionais e internacionais vigentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AVICULTURA

A produção de carne de frango no Brasil vem apresentando um crescimento contínuo na participação no mercado mundial de carnes, sendo que, em 2012, representou um consumo *per capita* de 11,9 kg, perdendo apenas para o consumo de carne suína. Porém, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO - *Food and Agriculture Organization*) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), no ano de 2022 haverá uma inversão de posição entre estas carnes. Assim, em menos de dez anos, as aves poderão estar na liderança do consumo mundial, com participação de 37% no total consumido, representando um aumento de 5,21% em relação a 2012 (AVISITE, 2013).

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Em 2014, a produção brasileira atingiu a marca histórica de 12,69 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, ficando atrás apenas de Estados Unidos e China. Deste total de produção, cerca de 67,7% permaneceram no mercado interno (ABPA, 2015). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial até 2020, sendo que a carne de frango alcançará 48,1% das exportações mundiais. Essas estimativas indicam que o Brasil pode manter a primeira posição como exportador mundial de carne de frango (MAPA, 2016).

O sistema muscular, que vem formar a parte comestível da ave – a carne – constitui aproximadamente 75% de seu peso, demonstrando sua importância em termos de consumo (ENGLERT, 1986). O Brasil possui a maior participação no comércio mundial de carne branca (peito), representando 63% (MENDES, 2014).

Entretanto, para acompanhar o aumento de produção, exportação e consumo de carne de frango nacional, foram necessárias diversas adaptações das instalações das granjas e uma evolução nos parâmetros zootécnicos, tais como genética, nutrição, sanidade e manejo das aves (LINZMEIER et al., 2009).

2.2 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

O cenário atual mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido (PASCHOAL; RATH, 2008). Com o objetivo de melhorar a saúde e o desempenho dos animais destinados ao consumo humano, desde 1950, um grande número de medicamentos veterinários vem sendo utilizado. Dentre estes medicamentos, os antibióticos são empregados tanto com a finalidade terapêutica e/ou profilática, a fim de melhorar a saúde dos animais destinados ao consumo humano, quanto como aditivos, agindo como promotores de crescimento (BOSCHER et al., 2010; BOUSOVA et al., 2013; ITO et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2012).

De acordo com Medeiros et al. (2009), frangos de corte tratados com rações nas quais foram acrescentadas doses profiláticas de antibióticos apresentam melhora no seu desempenho zootécnico. Isso acontece, provavelmente, devido ao controle de microrganismos comensais e moderadamente patogênicos que residem no trato gastrointestinal. Assim, ocorre redução da competição por nutrientes com o hospedeiro, melhorando sua absorção em decorrência da diminuição de bactérias produtoras de toxinas e amônia. Como consequência, há um melhor aproveitamento dos alimentos, uma redução da mortalidade e da morbidade por infecções clínica e subclínica e uma melhora da *performance* produtiva (MEDEIROS et al., 2009).

O uso destes fármacos tem despertado grande polêmica junto à sociedade, seja pela possibilidade real de remanescerem resíduos em produtos derivados de animais ou por aspectos ligados ao desenvolvimento de resistência bacteriana (BACCARO et al., 2002; BLATT; MIRANDA, 2005; SPINOSA et al., 2011). Atualmente, estima-se que mais da metade de todos os antibióticos produzidos no mundo são usados no tratamento de animais, fazendo com que seu uso abusivo possa promover sua presença em alimentos, causando possíveis efeitos adversos à saúde humana (HALLING-SORENSEN et al., 1998; MAGALHÃES et al., 2012). Os efeitos tóxicos causados em humanos incluem problemas auditivos, reações alérgicas, e até mesmo choque anafilático em indivíduos sensíveis (HALLING-SORENSEN et al., 1998).

De acordo com Botsoglou e Fletouris (2001), em princípio, todas as preparações de fármacos administrados aos animais podem deixar resíduos nos tecidos, no leite ou nos ovos. Porém, os níveis dos resíduos dependem da dose do fármaco administrado e do período entre sua administração e o abate do animal. Essa fase, conhecida como período de carência, é o período entre a administração do fármaco até sua biotransformação e excreção, de acordo com

sua farmacocinética. Neste intervalo, não deve haver abate do animal e nem coleta de leite. Respeitar este período é essencial para evitar resíduo do fármaco em níveis acima do LMR, assegurando a saúde do consumidor (BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001; MAPA, 2008).

Na Europa, onde é grande a pressão por parte dos consumidores e de grupos ativistas, o uso de antibióticos como agentes promotores de crescimento na produção animal foi proibido nos últimos anos. Em função disso, nos demais países produtores de aves - incluindo os Estados Unidos e o Brasil - vêm ocorrendo discussões sobre a necessidade de regulamentação ou, até mesmo, proibição da utilização destes compostos (ROSTAGNO, 2010). Porém, isto também implica em prejuízos, uma vez que estudos realizados por Santana et al. (2011) indicam que a simples retirada dos antibióticos promotores de crescimento da dieta das aves levaria a uma redução média no desempenho de 3 a 7%, além do impacto negativo sobre a saúde animal e o aumento da mortalidade.

Como consequência da proibição da utilização destas substâncias na Europa, tem ocorrido uma restrição à importação dos produtos originados destes animais. Como este bloco comercial é um grande formador de opinião, pode influenciar na decisão de grandes importadores, tais como a Ásia e o Oriente Médio. Portanto, o que o Brasil tem feito é adaptar-se às exigências internacionais de exportação e atender às legislações vigentes (SANTANA et al., 2011).

2.2.1 Fluorquinolonas e tetraciclina

Dentre as diversas classes de antibióticos, as FQs e as TCs recebem destaque devido à sua grande utilização na avicultura (KEMPER, 2008). De acordo com um estudo realizado em 2004, em 28 cooperativas integradas e abatedouros de frango de corte localizados no Paraná, verificou-se que FQs e TCs representavam, respectivamente, 34 e 6% dos grupos farmacológicos com função preventiva mais utilizados na fase de terminação do frango. Dos fármacos utilizados como terapêuticos, 19% eram FQs e 11% TCs (PAMVet/PR, 2005).

As TCs são bacteriostáticas e possuem amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, clamídias, micoplasmas, riquetsias, microrganismos anaeróbios e alguns protozoários, tais como Anaplasma, Theileria e Eperythrozoon. Porém, sua ação contra enterobactérias é cada vez mais limitada, devido à resistência antimicrobiana (BISHOP, 2001; BOTSOGLOU; FLETOURIS, 2001; HIRSH; ZEE, 2003; ITO et al., 2005; MICHALOVA et al., 2004).

A ação das TCs como promotores de crescimento foi descoberta em 1949, quando frangos receberam ração suplementada com clortetraciclina. Posteriormente, foram amplamente aplicadas na criação de animais, graças à melhoria da taxa de crescimento em relação ao consumo de alimento. Mais tarde, diversos estudos descreveram o efeito do uso de doses subterapêuticas de TCs por um longo período, resultando no aumento do nível de resistência de bactérias intestinais ou patógenas (MICHALOVA et al., 2004).

De Jong et al. (2009) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de isolados intestinais de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Enterococcus* spp. de frangos, suínos e bovinos em diversos países da UE. Os resultados mostraram que houve alta resistência à TC, principalmente, da *Escherichia coli* e da *Salmonella* spp.. Campos et al. (2013) avaliaram a resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. O teste de susceptibilidade antimicrobiana demonstrou que, das cepas isoladas, 90,47% de *E. faecalis*, 100% de *E. faecium* e 82,14% dos *Enterococcus* spp. apresentaram resistência à TC.

Da mesma forma, Zanatta et al. (2004) realizaram um estudo com objetivo de verificar a suscetibilidade de cepas de *Escherichia coli* de 120 amostras de aves com quadro clínico suspeito de colibacilose. Foi encontrado um grande número das amostras que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados, sendo que a maior resistência foi à TC (76%).

Das TCs disponíveis comercialmente, clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC) e doxiciclina (DOX) são as mais comumente aplicadas em animais produtores de alimentos (STOLKER; BRINKMAN, 2005). No Brasil, a legislação estabelece um LMR de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para CTC, OTC e TC e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DOX, em músculo de frango (BRASIL, 2014). Porém, o uso dessa classe como promotor de crescimento está proibido desde 2009 e, na Europa, desde 1970 (BRASIL, 2009; EUROPEAN COMMISSION, 1970).

As FQs pertencem a um grupo de antibióticos sintéticos derivados do ácido nalidíxico. Os compostos foram inicialmente aplicados no tratamento de infecções do trato urinário, mas agora têm uma aplicação de amplo espectro para o tratamento de doenças humanas e veterinárias. São indicadas para o tratamento das infecções por *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Enterobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Neisseria* sp., *Pseudomonas aeruginosa* (RONALD; DONALD, 2003). Em medicina veterinária, são usadas, principalmente, para o tratamento de infecções pulmonares, urinárias e digestivas (BALL, 2000; ITO et al., 2005; MALIK et al., 2010; POSYNIK, 1999).

Dentre as quinolonas e as FQs mais utilizadas na avicultura destacam-se: ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, enoxacina, enrofloxacina, flumequina, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico e sarafloxacina (ITO et al., 2005; PAPICH; RIVIERE, 2003; ROSE et al., 1998). A norfloxacina (NOR) é muito empregada na prática veterinária, pois possui amplo espectro de ação e baixo custo. Todavia, a enrofloxacina (ENR) é a principal FQ aplicada em animais produtores de alimentos e, mesmo não sendo utilizada no homem, seu principal metabólito, a ciprofloxacina (CIP), tem grande importância na medicina humana (FAO/WHO/OIE, 2008; WOODWARD, 2004). Por isso, este fármaco deve ser considerado como produto de última opção em medicina aviária (LÖHREN et al., 2010).

Fluorquinolonas já estiveram entre os antimicrobianos de eleição para tratamento de campilobacteriose humana. Porém, desde a década de 1990 tem ocorrido um aumento preocupante na prevalência de *Campylobacter* spp. isoladas de humanos e frangos resistentes a FQs. Este fato foi correlacionado com o uso desta classe de antimicrobiano na avicultura (PIDDOCK et al., 2003).

Por esse motivo, nos Estados Unidos e no Canadá, o uso dessa classe de fármacos em frangos foi banido após a decisão do FDA (AGUNOS et al., 2012; FDA, 2005). No Brasil, desde 2009, o uso de FQs foi proibido como promotor de crescimento ou como medicação preventiva, sendo permitido apenas para fins terapêuticos (BRASIL, 2009).

O maior risco da utilização de FQs e, neste caso em particular, da ENR (e do seu metabólito CIP), é a formação de cepas bacterianas resistentes no trato digestivo dos frangos. Sua utilização excessiva nestes animais faz com que as bactérias do trato digestivo estejam em contato permanente com o antibiótico, aumentando a probabilidade de surgir multirresistência bacteriana, formando, assim, um reservatório de bactérias resistentes às FQs. Outro fator a ser considerado é que, na maior parte das vezes, estas cepas de bactérias adquirem resistência à toda classe e não apenas aos fármacos que foram administrados (FAO/WHO/OIE, 2008).

Diferentes LMRs para FQs têm sido estabelecidos por agências regulatórias em diversos países. No Brasil e na UE, o LMR para a soma de ENR e seu metabólito CIP é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e, para NOR, ainda não há um valor estabelecido (BRASIL, 2014; EUROPEAN COMMISSION, 2010). Entretanto, no Japão, o LMR estabelecido para NOR é $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que para a soma de ENR e seu metabólito CIP, $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, 2006; THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2016a; 2016b).

2.3 LEGISLAÇÃO PARA USO DE ANTIBIÓTICOS EM ANIMAIS

Todos os estabelecimentos fabricantes ou representantes de medicamentos e aditivos para uso veterinário, sejam eles produzidos, importados, fracionados e/ou comercializados no Brasil, devem ser registrados no devido setor competente do MAPA. A legislação que regulamenta os quesitos necessários para realizar o registro de medicamentos ou aditivos para uso na avicultura é a mesma que regulamenta todos os demais setores da produção animal. Ou seja, não há uma legislação específica para os produtos utilizados na avicultura (ROSÁRIO, 2005).

Com o objetivo de garantir segurança aos consumidores, LMRs têm sido estabelecidos quanto à presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal. O risco à saúde humana quanto à presença destes compostos vem sendo avaliado, desde 1956, pelo Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA – *Joint Expert Committee of Food Additives*). O JECFA é administrado pela FAO e pela OMS e realiza a avaliação do risco associado ao consumo de aditivos alimentares, contaminantes, toxinas de ocorrência natural e resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, assessorando o *Codex Alimentarius* em suas decisões (ANVISA, 2015).

O EMA (*European Medicines Agency*) e o FDA estabeleceram valores de LMRs para cada substância em determinada matriz (rim, gordura, músculo, leite, etc.). De acordo com o EMA (2010), o valor de LMR é a concentração máxima em que uma substância pode estar presente no alimento de origem animal, sem que haja prejuízo à saúde do consumidor. No Brasil, a competência para estabelecer LMRs de resíduos e contaminantes em alimentos é do Ministério da Saúde, através da ANVISA (BRASIL, 1999).

No Brasil, somente em 1950, através da Lei nº 1.283, estabeleceram-se atribuições e competências relacionadas a produtos de origem animal (BRASIL, 1950). Em 1979, a fim de controlar os resíduos de substâncias de uso na agropecuária e poluentes ambientais em produtos de origem animal, foi criado o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes (PNCRBC) do Ministério da Agricultura, através da Portaria nº 86/79 (BRASIL, 1979). Em 1986, esta portaria foi revogada, dando lugar à Portaria nº 51 (BRASIL, 1986), a qual instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), adequada, mais tarde, pela Portaria nº 527/95 (BRASIL, 1995).

Em 1999, o PNCRB foi denominado Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR), através da Instrução Normativa (IN) nº 42 (BRASIL, 1999a). O objetivo desta era promover a melhoria da produtividade e da qualidade dos

produtos colocados à disposição da população brasileira, além de proporcionar à nação condições de adequação às regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e por órgãos auxiliares, tais como FAO e OMS. Este plano regulamentou os procedimentos para o monitoramento e a investigação dos níveis de resíduos e contaminantes nos setores de carne, mel, leite e pescado (BRASIL, 1999b).

Após, o PNCR passou a se PNCRC, sendo que, a cada ano, são publicadas instruções normativas referentes aos compostos a serem pesquisados e seus respectivos LMRs e resultados obtidos. O PNCRC/Animal é composto pelos seus programas setoriais para o monitoramento em carnes (bovinos, aves, suínos, equinos, avestruz, caprinos e ovinos) e demais produtos de origem animal (leite, mel, ovos e pescado) (BRASIL, 2015).

Deve ser ressaltada a importância que o PNCRC tem para o país. O não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos acarreta sérios problemas e embargo nas exportações para os principais países parceiros comerciais, já que é necessário assegurar a equivalência dos controles.

No ano 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu um Grupo de Trabalho (GT) sobre medicamentos veterinários em alimentos (BRASIL, 2000). Dois programas de monitoramento foram delineados: o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) e o Programa Nacional de Monitoramento e Controle de Resistência Microbiana em Alimentos de Origem Animal Expostos ao Consumo (PREBAF) (BRASIL, 2000).

Apesar de ter iniciado suas atividades em 2002, o PAMVet foi oficialmente instituído somente em setembro de 2003, pela RDC n° 253, com o objetivo de avaliar o potencial de exposição do consumidor aos resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio (BRASIL, 2003b).

Em 2005, com o decreto n° 5.351, houve uma reestruturação do MAPA e a consequente criação do Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários (DFIP), dentro da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Ambos tiveram a responsabilidade de inspecionar e fiscalizar os produtos de uso veterinário e os destinados à alimentação animal. Baseada neste decreto, foi instituída a Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes (CCRC), para implementar e monitorar os programas relacionados ao controle de resíduos e contaminantes em produtos agropecuários (BRASIL, 2005).

Em 2009, a IN n° 26 revogou a Portaria Ministerial n° 193/98 e aprovou o Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Através dela, ficou estabelecido que

anfenicóis, tetraciclina, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas são de uso exclusivo em produtos antimicrobianos de uso veterinário, sendo vedada sua utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009).

Em 2011, a IN nº 41 de 30 de agosto, alterou os artigos 14 e 15 do Anexo I da IN nº 26, de 09 de julho de 2009. A partir de então, os estabelecimentos detentores do registro de produtos antimicrobianos de uso veterinário para animais destinados à produção de alimentos, sem a especificação do período de carência ou que não apresentaram quando da concessão de registro, precisaram apresentar estudos que demonstrassem o período de carência a ser observado (BRASIL, 2011).

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Para atingir níveis de segurança exigidos por órgãos reguladores, dados confiáveis devem estar disponíveis para o monitoramento e a avaliação dos riscos aos quais a população está exposta, em relação à presença de resíduos e contaminantes em alimentos de origem animal. Em outras palavras, técnicas analíticas sofisticadas, com alta sensibilidade e especificidade devem ser empregadas.

A utilização de métodos analíticos sensíveis é imprescindível para garantir, através do controle de qualidade, a eficácia e a segurança do uso de um determinado medicamento. De acordo com a diretiva 2002/657/EC da Comunidade Europeia, os métodos que utilizam apenas a análise cromatográfica, sem recurso a um sistema de detecção baseado na espectrometria, não são adequados para utilização isolada enquanto métodos de confirmação (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Dessa forma, LC-MS/MS tornou-se, uma técnica essencial em laboratórios que realizam análise em alimentos (PRESTES et al., 2013).

De acordo com Bogialli e Di Corcia (2009), atualmente, mais de 90% dos métodos analíticos empregados para a análise de resíduos em alimentos são baseados nesta técnica. Além disso, geralmente, a cromatografia líquida utilizada é de fase reversa, com gradiente de fase móvel (BOGIALLI; DI CORCIA, 2009). A escolha da fase móvel adequada é outro fator importante a ser considerado. A utilização de fase móvel acidificada é comum para análise de antimicrobianos por LC-MS/MS no modo positivo de ionização por eletronebulização (ESI), uma vez que melhora a eficiência da ionização e o aumento do sinal (DI CORCIA; NAZZARI, 2002; GROS et al., 2013; PRADO; MACHINSKI JUNIOR, 2011).

Os analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo têm sido a escolha para análise de resíduos em diferentes tipos de alimentos. Neste caso, a fonte de ionização por ESI é a mais aplicada, devido à alta polaridade destes compostos (BOGIALLI; DI CORCIA, 2009; DI CORCIA; NAZZARI, 2002; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

As colunas analíticas mais utilizadas na separação de TCs são as de fase reversa C₈ ou C₁₈. As colunas de fase reversa com *end-capping* são as preferidas, devido à sua habilidade intrínseca de reduzir interações de silanóis. Para as FQs, as colunas mais utilizadas são de fase reversa C₁₈ ou alguma modificação dessa fase (Zorbax XDB-C₁₈, SynergiTM Hydro-RP C₁₈ e Kromasil ODS C₁₈) (SPELTINI et al., 2010).

2.5 PREPARO DE AMOSTRA

A complexidade da composição dos alimentos, ocasiona, muitas vezes, dificuldades para a quantificação de resíduos de antibióticos, sendo necessária a inclusão de uma etapa de limpeza do extrato após o processo de extração com solvente. Esta etapa é de fundamental importância, pois reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção frequente do sistema cromatográfico. Além disso, a manipulação das amostras deve evitar a possibilidade de uma contaminação acidental ou a perda das substâncias a serem analisadas (BOGIALLI; DI CORCIA, 2009; PRESTES et al., 2009).

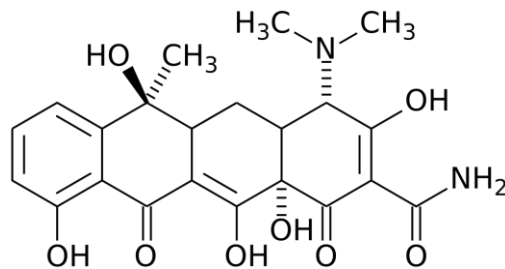
A maioria dos métodos de extração de resíduos de antibióticos em músculo de frangos descritos na literatura requer a utilização de uma etapa de purificação utilizando extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*). Com isso, o procedimento torna-se mais oneroso e trabalhoso, além de afetar a precisão e a exatidão do método (LOPES et al., 2011a; RUBIES et al., 2007; STUBBINGS; BIGWOOD, 2009; TAYLOR, 2005).

Recentemente, alguns autores têm desenvolvido métodos de extração de resíduos de medicamentos veterinários em fígado, músculo e leite sem a necessidade de purificação através de SPE. Assim, possibilita-se a realização de procedimentos com menores custo e tempo de trabalho (DE ALMEIDA, 2015; HOFF et al., 2015a, 2015b; JANK et al., 2015; MARTINS et al., 2014, 2015).

Segundo Berendsen et al. (2013), os tecidos animais, de uma maneira geral, requerem um tratamento prévio para a obtenção de uma amostra homogênea. A extração líquida de tecidos triturados e homogeneizados – como o músculo – é referida como extração em fase líquida.

O músculo de frango é composto, principalmente, por proteínas, lipídeos e minerais, tais como ferro, magnésio e zinco (KOBBLITZ, 2011). A presença destes metais torna-se um problema no caso das TCs. Devido à presença de dois grupos cetônicos nas posições 1 e 11 (Figura 1), estes fármacos podem quelar-se facilmente a íons metálicos, podendo ocorrer perda do analito durante o processo de preparo da amostra (ANDERSON et al., 2005; DI CORCIA; NAZZARI, 2002). Dessa forma, há a necessidade de utilização de um agente complexante, como EDTA ou ácido oxálico, para evitar este processo (BERENDSEN, 2013; BITTENCOURT et al. 2012; DI CORCIA; NAZZARI, 2002; GENTILI et al., 2005; MARTINS et al., 2015).

Figura 1 – Fórmula estrutural da tetraciclina



A presença de proteínas e lipídeos também deve ser considerada no processo de extração de antibióticos. Neste caso, uma eficiente etapa de purificação do extrato é essencial (BERENDSEN et al., 2013). Diversos autores têm reportado a acetonitrila como solvente de escolha para extração de resíduos de antibióticos. Suas vantagens estão ligadas à extração de componentes de diferentes polaridades, eficiente desnaturação de proteínas, além da possibilidade de extração de um menor número de coextrativos, tais como pigmentos e gorduras (BERENDSEN et al., 2013; CHIAOCHAN et al., 2010; MOL et al., 2008).

Além disso, um aumento na recuperação de alguns analitos pode ser verificado ao se acidificar a acetonitrila, sendo esta a melhor opção para análise por LC-MS/MS (BITTENCOURT et al. 2012; FREITAS, 2013; GAUGAIN-JUHEL et al., 2009; GENTILI et al. 2005; GOSETTI et al. 2010; MARTINS et al., 2015). Este é um fator importante, especificamente, no caso das FQs, que apresentam ácido carboxílico e grupos funcionais amina em sua estrutura química, conferindo a esta classe características anfotéricas (GAUGAIN-JUHEL et al., 2009; GENTILI et al. 2005; GOSETTI et al. 2010; SÁRKÖZY, 2001).

A utilização de temperaturas muito baixas (-70 °C) para separação de coextrativos gordurosos presentes nos extratos obtidos por extração líquido-líquido de amostras de origem animal foi descrita, inicialmente, por Juhler, em 1997, para determinação de resíduos de pesticidas (PRESTES et al., 2013). Recentemente, uma técnica baseada em partição à temperatura muito baixa, utilizando nitrogênio líquido, tem sido aplicada na extração de resíduos de medicamentos veterinários em músculo, fígado e leite (LOPES et al., 2011a, 2011b, 2012, 2013). No entanto, o uso de temperaturas tão baixas dificulta a aplicação da técnica na rotina, uma vez que é necessária a disponibilidade de nitrogênio líquido, bem como o monitoramento rigoroso do tempo de contato deste meio com a amostra.

A aplicação de temperaturas mais amenas tem sido descrita para a purificação de extratos de matrizes de origem animal. A técnica denominada extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (LLE-LTP - *liquid-liquid extraction with low temperature partitioning*) consiste na extração com um pequeno volume de solvente orgânico, geralmente acetonitrila, seguida de resfriamento do extrato a -20 °C por algumas horas, até o congelamento da fase aquosa e a precipitação dos sólidos gordurosos e peptídeos ainda solúveis. A acetonitrila permanece líquida, sendo retirada facilmente e o extrato pode ser analisado (PRESTES et al., 2009). Estudos mais recentes mostraram que é possível diminuir o tempo de congelamento para até 1 hora, obtendo-se um extrato límpido (MARTINS et al., 2014, 2015; RÜBENSAM et al., 2013).

2.6 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e objetivos criteriosos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método for modificado para atender aos requisitos específicos ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar-se de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002;).

O procedimento de validação de metodologias deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (PASCHOAL; RATH, 2008).

Para tanto, os parâmetros básicos de desempenho de um método a serem aplicadas são: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002;).

2.6.1 Especificidade e Seletividade

De maneira geral, uma amostra consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2011).

A seletividade garante que o sinal analítico seja exclusivamente do composto de interesse. Se este parâmetro não for assegurado, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011; RIBANI, et al., 2004).

2.6.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade dos métodos analíticos quantitativos é a capacidade de o método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

Na prática, a linearidade é determinada através de curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (LANÇAS, 2004).

É recomendado que seja determinada a análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Após, deve-se realizar o tratamento por métodos estatísticos para a determinação do coeficiente de correlação, sendo que o critério mínimo aceitável deve ser de 0,99 (INMETRO, 2011).

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2011).

2.6.3 Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, dentro de um nível de confiança especificado ou que pode ser especificamente diferente do ruído. O limite de detecção do equipamento é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. Já o limite de detecção do método é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011).

2.6.4 Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, para aquela condição analítica. Pode ser determinado por meio do ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011).

2.6.5 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro de um mensurando. Também pode ser definida como a tendência em apresentar resultado maior ou menor que o valor real, indicando a existência ou não de erro sistemático (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Quando não há material de referência certificado – que consiste em um material com conteúdo específico de substância a analisar, com valor de incerteza atribuído definido – a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação de matriz branca (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Os intervalos de valores aceitos para a exatidão do método estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Faixas de aceitação dos valores de recuperação para a exatidão do método.

Concentração	Intervalos (%)
$\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50 % a +20%
$> 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30 % a +10 %
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20 % a +10 %

Fonte: 2002/657/EC.

2.6.6 Precisão

A precisão de um método é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições específicas. O valor da precisão é calculado sob a forma de desvio padrão relativo (DPR%) ou coeficiente de variação (CV%). A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A repetitividade é definida como o resultado de ensaios independentes do mesmo método, com o mesmo material de ensaio, no mesmo laboratório, realizado pelo mesmo operador e utilizando o mesmo equipamento em um mesmo dia (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A precisão intermediária (ou reprodutibilidade intralaboratorial) refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais.

A reprodutibilidade não é um componente de validação de um método executado por um único laboratório, sendo obtida quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparações laboratoriais (INMETRO, 2011).

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

São parâmetros definidos na diretiva 2002/657/CE, que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de

concentração no qual se toma a ação regulatória, o chamado nível de interesse (EUROPEAN COMMISSION, 2002; MAPA, 2011).

O $CC\alpha$ é a concentração a partir da qual uma amostra pode ser declarada não conforme com uma probabilidade de erro igual a α (erro de 1% para substâncias não permitidas e de 5% para substâncias com LMR). No caso das substâncias com LMR, o $CC\alpha$ é a concentração a partir da qual, com uma certeza de 95% ($1-\alpha$), a substância está presente em concentração superior ao seu LMR (EUROPEAN COMMISSION, 2002; PASCHOAL; RATH, 2008).

O $CC\beta$ (capacidade de detecção) é a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro β . No caso das substâncias com LMR estabelecido, é a concentração em que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com certeza estatística de $1-\beta$ (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

2.6.8 Efeito matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (MAPA, 2011).

O FDA recomenda que esse parâmetro deva ser avaliado para validação de métodos empregando LC-MS ou LC-MS/MS para garantir que parâmetros como precisão, seletividade e sensibilidade não sejam afetados (PASCHOAL; RATH, 2008).

2.6.9 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto quando se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando o mesmo está sendo executado (PASCHOAL; RATH, 2008).

Enquanto órgãos como FDA e ANVISA não incluem a robustez na validação de métodos destinados à análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, a Comunidade Europeia recomenda a avaliação deste parâmetro, empregando um planejamento

fatorial (teste de Youden). Neste teste, são realizadas oito combinações de sete fatores de variáveis (PASCHOAL; RATH, 2008).

2.7 ESTUDO DE DEPLEÇÃO

Estudos de depleção podem ser considerados como o tempo necessário à progressiva eliminação do medicamento até os limites toxicologicamente toleráveis. Durante o processo de desenvolvimento de um medicamento veterinário, estudos de depleção são conduzidos a fim de determinar a concentração do(s) resíduo(s) presente(s) em produtos comestíveis (tecidos, leite, ovos ou mel) de animais tratados com o medicamento em estudo (EMA, 2015).

No caso de registro de um novo medicamento veterinário, a intenção é que um estudo de depleção de resíduos (por espécie), conduzidas no âmbito de qualquer região global, seja suficiente para satisfazer os requisitos de dados para estabelecimento de períodos de carência adequadas para um produto específico em animais produtores de alimentos (EMEA, 2009).

O período de carência (ou período de retirada), significa o intervalo de tempo entre a última aplicação do produto veterinário e o abate do animal tratado ou para o consumo de seus produtos. O respeito a este tempo garante a ausência de resíduos do produto em níveis acima dos LMRs. A determinação deste intervalo de tempo é complexa e depende da avaliação das características farmacológicas das substâncias envolvidas, quando em dada formulação, bem como da dosagem (que inclui dose, frequência de administração e duração de tratamento), via de administração e espécie animal em que o produto é administrado. Todas estas informações, juntamente com os demais dados de segurança dos fármacos, são avaliadas em conjunto nos chamados estudos de depleção de resíduos ou de determinação do período de carência (MAPA, 2011).

3 CAPÍTULO I

3.1 ARTIGO 1

Development and validation of a method to determinate fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Vanessa Gass da Silveira ^a, Maurício Schneider Oliveira ^a, Jane Foliatti Scheid ^a,
Louise Jank ^b, Carlos Augusto Mallmann ^{a, *}

De acordo com normas para publicação em: *Talanta*

(Artigo submetido ao periódico *Talanta* – 2016)

^a Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Laboratório de Análises Micotoxicológicas - LAMIC, CEP 97105 900, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8445.

E-mail address: mallmann@lamic.ufsm.br (C.A. Mallmann).

ABSTRACT

The presence of antibacterial drug residues in animal products is an important public health problem. These substances may be generated by poor production practices. Therefore, is important to develop a rapid and low-cost method to detect drug residues. This study developed a simple and fast method for extraction and chromatographic separation of fluoroquinolone (ciprofloxacin, enrofloxacin, and norfloxacin) and tetracycline (chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline, and tetracycline) residues in chicken muscle samples. The samples were pretreated with 150 mM EDTA to avoid chelation of tetracyclines. The samples were deproteinized and cleaned by the addition of acidified acetonitrile followed by vigorous shaking and centrifugation. The final supernatant was analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Linearity (r^2) above 0.99 was obtained for all analytes in concentrations from 0.0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, and $2.0 \times$ the maximum residue limit (MRL) levels. Intra- and inter-day precision with relative standard deviation (RSD) lower than 10% were obtained at levels of 0.5, 1.0, and $1.5 \times$ MRL levels, which was in agreement with the European Commission Decision 2002/657/EC standard. The method accuracy ranged from 97.33% to 103.22% for all analytes. Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) ranged from 1.0–10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 2.0–20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The decision limit ($\text{CC}\alpha$) and detection capability ($\text{CC}\beta$) ranged from 107.89–223.04 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 115.78–246.07 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The performance parameters were consistent with those of the 2002/657/EC. The method was applied to real samples. Three samples were contaminated with enrofloxacin, but they were below the MRL established by Brazilian legislation. This simple and fast method was optimized to provide a rapid and efficient protocol for routine laboratory work to quantify fluoroquinolone and tetracycline residues in broiler chicken muscle.

Keywords: antibiotic residues; veterinary drugs; LC-MS/MS; food analysis; mass spectrometry.

1. INTRODUCTION

Industrial agricultural practices include large-scale use of veterinary drugs as growth-promoters, to prevent disease outbreaks or treat diseases, for dairy production purposes, or to prevent losses during transportation of farm animals such as pigs, cows, turkeys, and chickens. These drugs and their residues and metabolites can accumulate in edible tissues, which can be very problematic because they can cause allergic reactions in some hypersensitive individuals, they can delay or destroy the growth of fermenting bacteria [1-3], and sustained use of low doses of veterinary drugs can cause bacterial resistance [2, 4-7].

To protect consumers, government authorities and regulatory agencies have established maximum residue limits (MRLs) for veterinary drugs in food [8-9]. In Brazil, residues and MRLs that must be monitored are established by the National Residue Control Plan (NRCP). The NRCP primarily monitors the incidence of residues and prevents potential risks to the populations exposed to affected products [9-10]. Tetracyclines (TCs) and fluoroquinolones (FQs) are antibiotics that are widely used in veterinary practice due their low price, broad spectrum, and low level of metabolism in the body. Irresponsible use of these drugs may result in the presence of residues above MRLs [11-16].

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the most suitable method for determining veterinary drug residues in food because it can detect a large number of compounds from different classes with high sensitivity and selectivity, while reducing the rate of false positives and negative results [17-18]. Generally, methods to analyze drug residues are validated according to regulatory protocols or guidelines [8]. In Brazil, the NRCP recommends the use of an internal validation manual, which is in agreement with the European Commission Decision 2002/657/EC [19].

Sample preparation is the major bottleneck in any analytical procedure for the determination of multiclass chemical residues in food products. Most extraction methods for

antibiotic residues in chicken muscle described in literature require a purification step using solid phase extraction (SPE), which makes the process labor-intensive and costly, and significantly affects the accuracy and precision of results [20-23]. Recent studies have reported alternative extraction methods of liver and muscle without the need for SPE purification [24-27].

The aim of this work was develop and validate a method that can be used to analyze seven antibiotics of two different classes (FQs and TCs) that are widely used in poultry production. The method does not use SPE for chicken muscle sample preparation and it was validated in accordance with the European Commission Decision 2002/657/EC and the Brazilian Analytical Quality Assurance Manual [8,19]. Compound and residue recovery, matrix effect, selectivity, specificity, linearity, precision (intra- and inter-day precision), accuracy, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), decision limit ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$), robustness, and applicability were evaluated and determined for real samples.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals and reagents

Analytical standards of chlortetracycline (CTC), doxycycline (DOX), oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), norfloxacin (NOR), demeclocycline (DEM), and enrofloxacin-d₅ (ENR-D5) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). Acetonitrile, methanol, and formic acid [high performance liquid chromatography (HPLC) grade were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q System (Millipore, Bedford, MA USA). Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na₂EDTA) was purchased from Merck

(Darmstadt, Germany). After preparation, samples were filtered through a Captiva Premium Syringe Filter Nylon (0.45 μm , Agilent Technologies Inc., USA).

2.2. Standard solutions

Stock standard solutions of individual compounds with concentrations between 500 and 1,000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ were prepared in methanol, acetonitrile, or water. Norfloxacin was prepared with the addition of 500 μL of acetic acid. A multicomponent working standard solution of FQs and TCs (2 and 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was prepared by appropriate dilution of the stock solutions with methanol. Stock standard and multicomponent working standard solutions were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively.

2.3. Chromatographic and mass spectrometric conditions

Chromatographic analyses were performed using an Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technologies Inc., USA) coupled to a 4000 QTRAP mass spectrometer (SCIEX, Canada) equipped with an electrospray ionization interface (ESI). Instrument control and data processing were performed with Analyst 1.5.1 software. Separation was achieved in a Zorbax SB-C₁₈ LC column (50 \times 4.6 mm, 1.8 μm particle diameter) with a C₁₈ column guard (12.5 \times 4.6 mm, 5 μm particle diameter), both from Agilent Technologies.

The gradient elution was performed using a mobile phase (flow rate at 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) containing water (solvent A) and methanol (solvent B), both acidified with 0.1% formic acid. The gradient elution program was as follows: 0–1 min, isocratic step with 5% B; 1–7.5 min, gradient to 99% B; 7.5–9 min, isocratic step with 99% B; 10 min, returned to initial composition of 5% B.

The ion source-dependent parameters were optimized using the following flow injection analysis approach: curtain gas (CUR) at 15 psi, collision-activated dissociation gas (CAD) was set to medium, source temperature 650 °C, dry gas 1 (GS1) and dry gas 2 (GS2) at 45 psi, and the spray voltage was set to 5,000 V. Detection was performed in positive-ion mode using multiple reaction monitoring (MRM), which monitors two transitions for each analyte. The retention times and compound-dependent parameters of the optimized LC-MS/MS method are presented in Table 1.

2.5. Muscle samples

Chicken muscle samples (breast) were obtained from a local slaughterhouse and were analyzed to provide a blank sample for validation. Before analysis, samples were homogenized and triturated using a meat mixer. A 2 ± 0.1 g aliquot was weighed into a 50 mL polypropylene centrifuge tube and stored at -20 °C until analysis. A total of 65 chicken muscle samples (breast) were obtained from a local slaughterhouse and analyzed.

2.6. Sample extraction procedure

Samples were held at room temperature until defrosted. Then, 400 μ L of 150 mM EDTA was added to avoid chelation of TCs, mixed in a vortex (10 s), and allowed to stand for 10 min at room temperature. Samples were spiked with the appropriate amount of internal standard (ENR-D5 for FQs and DEM for TCs) to achieve $0 \times$ MRL, $0.25 \times$ MRL, $0.50 \times$ MRL, $1.0 \times$ MRL, $1.5 \times$ MRL, and $2.0 \times$ MRL. The controls were spiked with the appropriate amount of standard to achieve the same MRL ratios. The samples were allowed to stand for 10 min in a dark room at room temperature before adding 800 μ L of water, and then samples

were homogenized and kept in the refrigerator for 30 min. Antibiotics were extracted with 6 mL of acetonitrile acidified with 0.1% (v/v) formic acid, mixed by vortexing for 20 min, and then placed in orbital shaker for 10 min at 180 rpm. The homogenate was centrifuged at $3,100 \times g$ for 10 min at 4 °C, the upper layer was transferred to a 15 mL polypropylene centrifuge tube, and kept in a freezer (-20 °C) for 1 h. Then, samples were thawed, centrifuged at $3,100 \times g$ for 10 min at 4 °C, and the supernatant was transferred into a glass tube, and all solvent was evaporated at 40 ± 2 °C under nitrogen flow. The sample was resuspended with 1 mL of water:methanol (70:30), transferred to a microtube, and centrifuged again at $20,800 \times g$ for 10 min at 4 °C. Finally, the supernatant was filtered through a nylon filter (0.45 μm), and 5 μL of sample was injected into the LC-MS/MS system for analysis.

3. VALIDATION PROCEDURE

The method was validated according to the protocols established by the European Commission Decision 2002/657/EC [8] for veterinary drug residues and the Brazilian Manual of Analytical Quality Assurance for Residues Control [19]. The following performance characteristics of the quantitative method were evaluated: recovery, matrix effect, selectivity/specificity, linearity, precision (intra- and inter-day precision), accuracy, and method sensitivity according to LOD, LOQ, $CC\alpha$, $CC\beta$, and robustness. Linearity was evaluated using matrix-matched calibration (MMC), by spiking blank muscle matrix at six concentration levels between 0–200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for FQs and between 0–400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for TCs. This range included the lower MRLs established by Brazilian legislation (Table 2) for the analytes studied.

Selectivity was assessed using muscle samples ($n = 21$) obtained from different producers. The use of two transitions for each analyte meet the necessary identification points

was monitored in the presented method (Table 1). For the specificity test, 20 blank poultry muscle samples were obtained from different producers to check for any interferences in the retention times. Then, blank samples were spiked with the studied analytes at the MRL levels. Decreasing concentrations of each antibiotic were spiked in blank muscle samples, the samples were extracted using the developed method, and then analyzed by LC-MS/MS. LOD and LOQ were estimated using a signal-to-noise ratio (S/N) in which the signal must be 3 and 10 times higher than the noise, respectively.

Recovery and intraday precision (repeatability) were evaluated by spiking blank samples at three concentration levels (0.5, 1.0, and 1.5 × MRL), and analyzing 7 replicates for each concentration level in one day. Interday precision was evaluated by spiking blanks with the same concentration levels on three different days. The precision values were calculated as coefficients of variation (CV%). The method accuracy was assessed by a recovery test using these same samples at 0.5, 1.0, and 1.5 × MRL. The limits adopted were for concentrations higher than 10 µg·kg⁻¹, which requires values between 80% and 110% [8].

To evaluate the matrix effect, calibration curves were prepared with and without added matrix in four replicates. The average response of the analytes from the calibration curves (in the same concentration range), were compared using the statistical F-test (Fisher-Snedecor) for variance homogeneity, and the *t*-test at 95% significance for evaluating the variance and means between the slopes of the calibration curves. To prove that the matrix effect is not significant, there should be no matrix effect at any concentration of the calibration curve [19].

The CC_α and CC_β values were calculated by plotting all data obtained from the precision study and applying the calibration curves approach as described in the European Commission Decision 2002/657/EC [8]. Briefly, the signal was plotted against the added concentration and the corresponding concentration at the y intercept plus 1.64 times the standard deviation of the within-laboratory reproducibility to obtain the CC_α values.

Detection capability was calculated by summing the concentration at the $CC\alpha$ and 1.64 times the standard deviation of the within-reproducibility mean measured content at the MRL concentration level.

Robustness experiments using the Youden test were performed. Briefly, blank muscle samples were spiked at the MRL level for each analyte and then assayed. Table 3 summarizes the factors chosen and changed ($n = 7$). Three replicates were analyzed in each experiment.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Optimization of analytical method

The results obtained from a typical MRM chromatogram of blank and spiked muscle samples at the MRL level are shown in Figure 1. Individual extracted ion chromatograms for FQs and TCs are shown in Figures 2 and 3, respectively. Several experiments were conducted to evaluate different solvents and additives in the mobile phases. A test of acetonitrile or methanol as the organic phase indicated that methanol provided better peak resolution and sensitivity. The addition of 0.1% (v/v) formic acid in both solvents A (water) and B (methanol) yielded higher analyte signal response and thus higher sensitivity. The addition of formic acid to aqueous and organic mobile phases has been reported in the literature for methods of chromatographic separation of multiresidue veterinary drugs [24-25,28-30]. Mobile phase composition and the gradient program are significant factors that must be considered in multiresidue analysis based on LC-MS/MS. Acidification of the mobile phase is important for achieving good analyte ionization, and a gradient program is important for achieving sufficient analyte separation with minimum interference from the matrix [25].

Chromatographic separation of the studied FQs and TCs was performed using a 50×4.6 mm, $1.8 \mu\text{m}$ particle size column to reduce the separation time. The gradient program was

optimized to achieve optimal separation of all compounds in less than 10 min. Parameters such as flow rate, column temperature, and injection volume were tested to obtain the best results with the conditions described in Section 2.3. A high percentage of methanol at the end of each chromatographic run prevented potential carry-over effects.

4.2. Muscle extraction

The method used for sample preparation for residue analysis of veterinary drugs in animal products is of critical importance for the time required for analysis, sample throughput, toxicity, and costs for analysis [17]. In this work, we added 400 μL of 150 mM EDTA to the samples at the beginning of the extraction procedure. TCs contain two ketone groups, which promotes chelation of metal ions present in the matrices and leads to analyte losses during sample preparation. For this reason, many authors have recommended the use of chelating agents such as EDTA salts for the analysis of veterinary drug residues [17,25,31-32].

The properties of the selected extraction solvent are crucial. Granelli et al. [33] studied a single extraction of bovine and porcine muscle and kidney samples using methanol. Granelli and Branzell [34] showed that methanol and acetonitrile provided the best results for multiresidue analysis in muscle and kidney. Acetonitrile provides very efficient extraction with high extraction recoveries, minimizes co-extraction of lipids, lowers matrix effects, and is efficient for protein denaturation [17,35-36]. Due to the presence of carboxylic acid and amine functional groups, quinolones have amphoteric and zwitterionic properties. Therefore, acidified acetonitrile is advantageous for efficient extraction of FQs, and provides the best solubility of these drugs [25,31-32,37-39].

Some clean-up techniques were shown to be beneficial for analysis of veterinary drugs in products of animal origin, including centrifugation and low-temperature phase separation

[23-25,40]. We used both techniques in our method, and they are effective for promoting complete precipitation of matrix proteins and co-extracted compounds. Some studies used ultra-low temperatures and froze the aqueous fraction by immersing the test tube in liquid nitrogen [17,23]. This approach is faster, but the contact time of the sample with liquid nitrogen must be strictly controlled to avoid freezing of acetonitrile. This step also requires stocking and use of liquid nitrogen, which adds to the cost of the method. Therefore, we chose to keep samples in a standard freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), because it is more practical for routine laboratory work. At the end of the extraction procedure, samples were filtered through a nylon filter ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) to remove any suspended particles.

4.3. Method validation

Decision limit and detection capability

The calculated $\text{CC}\alpha$ and $\text{CC}\beta$ values are shown in Table 2. Although these parameters do not include criteria for upper limits, the experimentally determined values were considered satisfactory. The decision limit was determined using batches containing 21 spiked samples, with each batch at a different concentration level, corresponding to 0.5, 1.0, and $0.5 \times \text{MRL}$ values for each analyte (Table 2). An MRL value has not been established for NOR, so the NOR MRL was considered to have the same value as other FQs (i.e., $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Sensitivity and specificity

The method sensitivity was determined by means of LOD and LOQ for each drug. The results obtained are shown in Table 2. The CV% for 6 replicates in the LOQ value was below 15% for all analytes.

Blank poultry muscle samples ($n = 20$) were analyzed to evaluate the presence of interferences. No significant interference was observed for any analytes, and the two chosen transitions were well detected. The method was considered as specific for all studied compounds.

Accuracy, linearity, and intra- and inter-day precision

Linearity was observed for all drugs with determination coefficients (r^2) higher than 0.99. Deviations of individual points from the calibration curve were less than 15%, and residuals were less than 20%. The method showed average recoveries ranging from 97.33–103.22%, proving its accuracy (Table 4). The results for intraday precision (repeatability) were calculated by means of CV%, and ranged between 1.94–9.39%. Interday precision (reproducibility) was less than 10% for all analytes. The method was considered reproducible since all CV values were less than 23%, which was the upper limit for the MRL level calculated using the Horwitz equation. All results are summarized in Table 4.

Matrix effect

No significant analytical differences were observed between the curves prepared in matrix versus those prepared in solvent. This result indicates that there is no matrix effect. The protein precipitation and clean-up steps were effective, which was demonstrated by the lack of significant signal enhancement or suppression, and the demonstration of no interference in the MS/MS detection that could affect the determination. It can be assumed that the matrix components responsible for possible interference were effectively removed.

Robustness

Experiments using the Youden approach were performed to evaluate the method behavior when subjected to minor and major changes, as described in Table 3. The standard

deviation of the intralaboratory reproducibility (s_{repro}) was compared with a standard deviation of the difference of factors for the robustness evaluation (s_{factor}). If $s_{\text{factor}} > s_{\text{repro}}$, this implies that the method lacks acceptable robustness [41].

Significant differences were observed between s_{factor} and s_{repro} for TC, CIP, and NOR, indicating that the method was not sufficiently robust for these analytes for the tested changes. The main factor of influence was the reduction of formic acid concentration from 0.1% to 0.05% in mobile phase A (aqueous solution). Therefore, it is important to maintain a concentration of 0.1% formic acid in both solvents. The data indicated that CTC, DOX, OTC, and ENR responses were robust for all factors evaluated, with $s_{\text{factor}} < s_{\text{repro}}$.

Sample analysis

The developed method was applied to the determination of veterinary drug residues in 65 chicken samples obtained from a local slaughterhouse. The results showed that three samples were contaminated with ENR (Figure 4). These samples were quantified, and we measured $45.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (A), $20.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (B), and $15.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (C) ENR, which were all below the MRL. Therefore, the detection of this compound in the analyzed samples may indicate the widespread use of this drug. This study shows that rigorous monitoring of animal products is important, along with the use of drugs in compliance with established doses and withdrawal periods by producers.

5. CONCLUSIONS

A simple, sensitive, and reproducible method was developed and validated to quantify seven veterinary antibiotics (FQs and TCs classes), which are widely used in chicken production. Furthermore, in this method we did not use SPE column. This protocol utilizes LC-MS/MS analysis, and is a fast and effective methodology for routine laboratory work. The

results obtained in the validation procedure showed excellent precision and accuracy for all tested drugs. The performance parameters of the method comply with the international standards and guidelines used for the validation. The method can be used to determine FQ and TC residues in muscle for future depletion studies with broiler chicken.

Acknowledgments

This work was performed and partly financed by Laboratório de Análises Micotoxicológicas in Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM) as part of the doctoral thesis of the first author. We would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior (CAPES), for granting a scholarship to the first author. The authors are grateful to BioMed Proofreading for the manuscript English review.

REFERENCES

- [1] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15–53. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305002797>>. Accessed in: 02 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.02.037.
- [2] F. Baquero, J.-L. Martínez, R. Cantón, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, *Curr. Opin. Biotechnol.* 19 (2008) 260-265. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166908000591>>. Accessed in: 04 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.

- [3] G. Bretschneider, J.C. Elizalde, F.A. Pérez, The effect of feeding antibiotic growth promoters on the performance of beef cattle consuming forage-based diets: A review, *Lives. Sci.* 114 (2008) 135–149. Retrieved from: <[http://www.livestockscience.com/article/S1871-1413\(07\)00572-0/pdf](http://www.livestockscience.com/article/S1871-1413(07)00572-0/pdf)>. Accessed in: 02 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.livsci.2007.12.017.
- [4] R. Wise, Antimicrobial resistance: priorities for action, *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (2002) 585–586. Retrieved from: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/49/4/585.full.pdf+html>>. Accessed in: 04 dec. 2015. DOI: 10.1093/jac/49.4.585.
- [5] H. Esaki, A. Morioka, K. Ishikara, H. Kojima, S. Shiroki, Y. Tamura, T. Takahashi. Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (2004) 266–270. Retrieved from: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/53/2/266.full.pdf+html>>. Accessed in: 03 dec. 2015. DOI: 10.1093/jac/dkh081.
- [6] J. Turnidge, Antibiotic use in animals - prejudices, perceptions and realities, *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (2004) 26–27. Retrieved from: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/53/1/26.full.pdf+html>>. Accessed in: 05 dec. 2015. DOI: 10.1093/jac/dkg493.
- [7] M. Norstrom, M. Hofshagen, T. Stavnes, J. Schau, J. Lassen, K. Kruse, Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from humans and broilers in Norway, *Epidemiol. Infect.* 134 (2006) 127–130. Retrieved from: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=369933&fileId=S0950268805004814>>. Accessed in: 08 dec. 2015. DOI: 10.1017/S0950268805004814.

[8] European Commission. Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. Official Journal of the European Communities, Bruxelles, 12 August 2002, L221, 8-36, 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

[9] A.D.Q. Mauricio, E.S. Lins, M.B. Alvarenga, A national residue control plan from the analytical perspective-the Brazilian case. *Anal. Chim. Acta.* 637 (2009) 333–336. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008017066>>. Accessed in: 05 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2008.09.061.

[10] A.D.Q. Mauricio, E.S Lins, The national agricultural laboratories of Brazil and the control of residues and contaminants in food, *Food Addit. Contam. Part A* 29 (2012) 482–489. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2011.620987?journalCode=tfac20>>. Accessed in: 05 dec. 2015. DOI:10.1080/19440049.2011.620987.

[11] M. Cherlet, S. de Baere, P. de Backer, Quantitative analysis of oxytetracycline and its 4-epimer in calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry, *Analyst* 128(7) (2003) 871–878. Retrieved from: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2003/an/b301104f>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI: 10.1039/b301104f.

[12] L. Kelly, D.L. Smith, E.L. Snary, J.A. Johnson, A.D. Harris, M. Wooldridge, J.G. Morris Jr, Animal growth promoters: to ban or not to ban? A risk assessment approach,

Int. J. Antimicrob. Ag. 24 (2004) 7-14. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857904001864>>. Accessed in: 16 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2004.04.007.

[13] G. Ternak. Antibiotics may act as growth/obesity promoters in humans as an inadvertent result of antibiotic pollution?, *Med. Hypotheses* 64 (2005) 14–16. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987704004657>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.mehy.2004.08.003.

[14] A.A.M. Stolker, T. Zuidema, M.W.F. Nielen, Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 967–979. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993607002063>>. Accessed in: 17 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2007.09.008.

[15] S. Bogialli, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Laganà, S. Nicolardi, A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk, *Food Chem.* 108 (2008) 354–360. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607010667>>. Accessed in: 17 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.044.

[16] N. Kemper, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecol. Indic.* 8 (2008) 1-13. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X07000647>>. Accessed in: 12 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.

[17] B.J.A. Berendsen, L.A.M. Stolker, M.W.F. Nielen, Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 229-239. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599361200307X>>. Accessed in: 20 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2012.09.019.

[18] O.D. Prestes, M.L. Martins, C.A. Friggi, J.S. Munaretto, M.B. Adaime, R. Zanella, O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, *Quim. Nova* 36 (2013) 697-710. Retrieved from: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v36n5/15.pdf>> Accessed in: 02 dec. 2015. DOI: 10.1590/S0100-40422013000500015.

[19] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Manual de garantia da qualidade analítica. Resíduos e Contaminantes em Alimentos, 1 st ed., MAPA/ACS, Brasília, 2011.

[20] P.J. Taylor, Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328–334. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912004003364>>. Accessed in: 05 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.

[21] A. Rubies, R. Vaquerizo, F. Centrich, R. Compañó, M. Granados, M.D. Prat, Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection, *Talanta* 72 (2007) 269–276. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003991400600717X>>. Accessed in: 15 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.10.030.

[22] G. Stubbings, T. Bigwood, The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68–78. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009001007>>. Accessed in: 15 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.029.

[23] R.P. Lopes, D.V. Augusti, A.G.M. Oliveira, F.A.S. Oliveira, E.A. Vargas, R. Augusti, Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis, *Food Addit. Contam. Part A* 28 (2011) 1667-1676. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2011.609136?journalCode=tfac20>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI:10.1080/19440049.2011.609136.

[24] M.T. Martins, J. Melo, F. Barreto, R.B Hoff, L. Jank, M.S. Bittencourt, J.B. Arsand, E.E.S. Schapoval, A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta* 129 (2014) 374-383. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014003270>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.04.049.

[25] M.T. Martins, F. Barreto, R.B. Hoff, L. Jank, J.B. Arsand, T.C. Feijó, E.E.S. Schapoval, Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A* 32 (2015) 333–341. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2015.1007091?journalCode=tfac2>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI: 10.1080/19440049.2015.1007091.

[26] R.B. Hoff, G. Rübensam, L. Jank, F. Barreto, M.C.R. Peralba, T.M. Pizzolato, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis, *Talanta* 132 (2015) 443–450. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014007267>>. Accessed in: 13 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.08.046.

[27] R.B. Hoff, T.M. Pizzolato, M.C.R. Peralba, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC–QqLIT-MS/MS), *Talanta* 134 (2015) 768–778. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003991401400873X>>. Accessed in: 13 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.10.045.

[28] R.P. Lopes, R.C. Reyes, R. Romero-González, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta* 89 (2012) 201-208. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011010794>>. Accessed in: 17 dec. 2015. DOI:10.1016/j.talanta.2011.11.082.

[29] B. Gorissen, T. Reyns, M. Devreese, P. De Backer, J. Van Loco, S. Croubels, Determination of selected veterinary antimicrobials in poultry excreta by UHPLC-MS/MS, for application in Salmonella control programs, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4447-4457. Retrieved from: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-014-8449-5>>. Accessed in: 17 dec. 2015. DOI: 10.1007/s00216-014-8449-5.

[30] J. Hou, W. Wan, D. Mao, C. Wang, Q. Mu, S. Qin, Y. Luo, Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China, *Environ Sci Pollut Res* 22 (2015) 4545-4554. Retrieved from: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-014-3632-y>>. Accessed in: 07 dec. 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3632-y.

[31] M.S Bittencourt, M.T. Martins, F.G. de Albuquerque, F. Barreto, R. Hoff. High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure, *Food Addit. Contam. Part A* 29 (2012) 508–516. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2011.606228?journalCode=tfac20#.VruJZlgrLIU>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI:10.1080/19440049.2011.606228.

[32] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, Liquid chromatography tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 705–733. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000889>>. Accessed in: 23 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2005.02.007.

[33] K. Granelli, C. Elgerud, A. Lundström, A. Ohlsson, P. Sjöberg, Rapid multi-residue analysis of antibiotics in muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 637 (2009) 87–91. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008015262>>. Accessed in: 18 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2008.08.025.

- [34] K. Granelli, C. Branzell, Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 586 (2007) 289–295. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006023919>>. Accessed in: 18 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2006.12.014.
- [35] H.G.J. Mol, P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T.C. de Rijk, A.A.M. Stolker, P.P.J. Mulder, Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9450–9459. Retrieved from: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac801557f>>. Accessed in: 20 dec. 2015. DOI: 10.1021/ac801557f.
- [36] C. ChiaoChan, U. Koesukwiwat, S. Yudthavorasit, N. Leepipatpiboon, Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle, *Anal. Chim. Acta.* 682 (2010) 117-129. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267010012304>>. Accessed in: 20 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2010.09.048.
- [37] M. Gaugain-Juhel, B. Delepine, S. Gautier, M.P. Fourmond, V. Gaudin, D. Hurtaud-Pessel, E. Verdon, P. Sanders, Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach, *Food Addit Contam.* 26 (2009) 1459-1471. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030903150575>>. Accessed in: 22 dec. 2015. DOI: 10.1080/02652030903150575.

- [38] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3929-3937. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309017397>>. Accessed in: 21 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.060.
- [39] A. Freitas, J. Barbosa, F. Ramos, Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk, *Int. Dairy J.* 33 (2013) 38-43. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694613001520>>. Accessed in: 22 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.05.019.
- [40] G. Rübensam, F. Barreto, R.B. Hoff, T.M. Pizzolato, Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup, *Food Control* 29 (2013) 55-60. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003106>>. Accessed in: 20 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.075.
- [41] M.P. De Almeida, C.P. Rezende, F.D. Ferreira, L.F. De Souza, D.C.S. De Assis, T.C. De Figueiredo, M.O. Leite, S.V. Cançado, Optimization and validation method to evaluate the residues of β -lactams and tetracyclines in kidney tissue by UPLC-MS/MS, *Talanta*, 144 (2015) 922-932. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914015301727>>. Accessed in: 18 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.07.048.

Table 1.

Mass spectrometry conditions and retention times for selected compounds.

Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>) [M+H] ⁺	Product ions (<i>m/z</i>) ^a	Declustering potential (V)	Collision energy (V) ^a	Cell exit potential (V) ^a	Retention time (min)
CIP	332.0	231.1/314.1	61	53/33	18/16	5.13
ENR	360.2	316.1/245.1	81	29/39	16/14	5.17
NOR	320.0	302.2/276.0	61	33/27	16/14	5.01
ENR_d5	365.1	321.3/245.1	76	31/52	16/8	5.14
CTC	461.1	426.2/201.1	56	29/59	12/10	5.81
DOX	445.1	428.0/267.0	66	37/49	10/14	6.34
OTC	479.1	444.0/462.0	61	33/30	24/12	5.06
TC	445.1	410.0/154.1	66	27/39	22/8	4.96
DEM	465.0	448.2/154.0	61	27/43	12/10	5.38

^aNumerical values are given in the order quantifier/qualifier ion.

Table 2.
MRL, LOD, LOQ, $CC\alpha$ and $CC\beta$ values obtained for the studied analytes.

Analyte	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
CIP	100	2	5	108.32	116.64
ENR	100	1	2	107.89	115.78
NOR	---	2	5	109.56	119.12
CTC	200	10	20	223.02	246.03
DOX	100	10	20	223.04	246.07
OTC	200	10	20	220.42	240.84
TC	200	10	20	215.11	230.22

Table 3.
Nominal conditions and variations for muscle samples evaluated in Youden design.

Number	Factors	Nominal condition	Variation
1	Batch of Methanol	Batch A	Batch B
2	Additive in mobile phase A	Formic acid 0.1%	Formic acid 0.05%
3	Additive in mobile phase B	Formic acid 0.1%	Formic acid 0.05%
4	Time of low temperature for protein precipitation	-20 °C at 1 h	-20 °C at 45 min
5	Column temperature	35 °C	32 °C
6	Source temperature	650 °C	620 °C
7	Flow rate	1 mL min ⁻¹	0.98 mL min ⁻¹

Table 4.
Precision and accuracy of antibacterials in poultry muscle.

Analyte	Intraday precision (CV%)			Inter-day precision (CV%)			Accuracy (%)		
	0.5 x MRL	1.0 x MRL	1.5 x MRL	0.5 x MRL	1.0 x MRL	1.5 x MRL	0.5 x MRL	1.0 x MRL	1.5 x MRL
CIP	7.13	3.20	3.45	6.78	4.96	3.47	101.87	97.33	100.69
ENR	7.06	5.55	1.94	6.72	5.70	2.25	99.21	101.81	99.08
NOR	9.39	5.81	3.03	8.82	6.65	3.45	101.36	98.30	101.10
CTC	2.29	5.81	5.39	2.95	6.50	5.50	98.51	103.22	98.32
DOX	2.20	4.55	5.47	3.22	6.24	5.79	98.37	102.24	98.19
OTC	2.53	3.28	5.60	2.88	4.25	5.60	98.64	102.57	98.35
TC	2.60	2.15	4.57	2.43	2.09	4.31	99.11	101.84	98.78

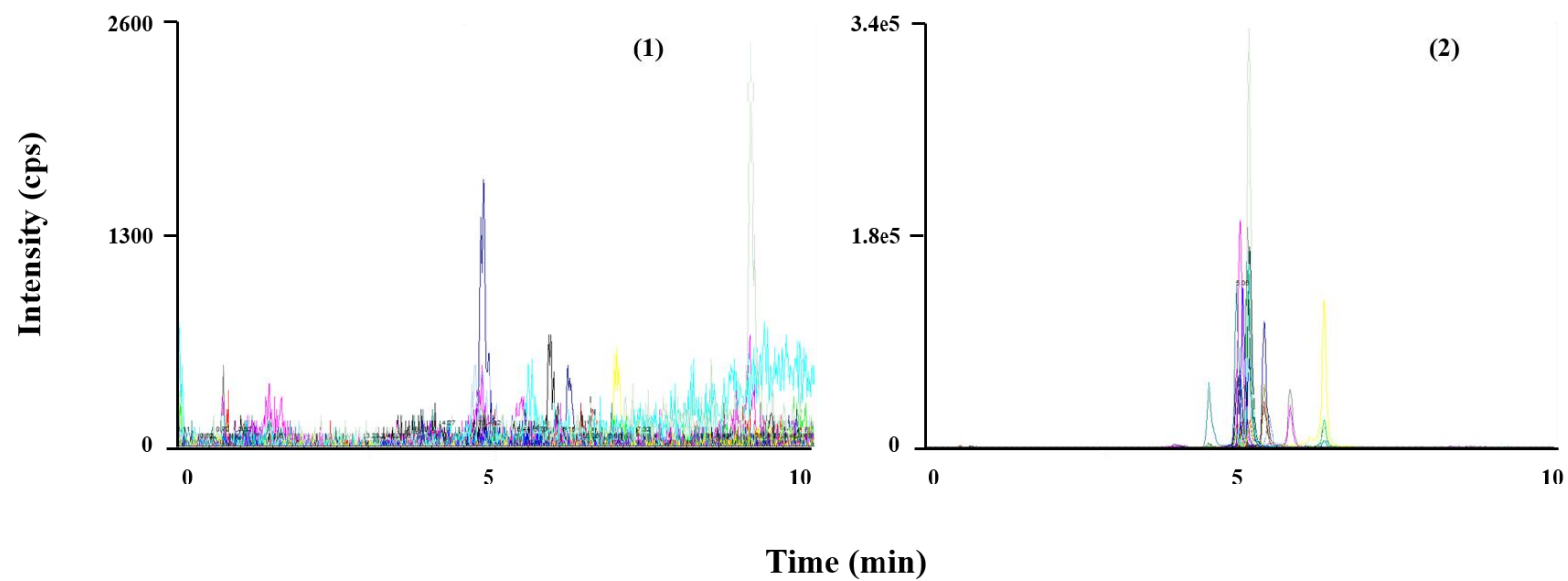


Fig. 1. Multiple Reaction Monitoring chromatograms for 7 antibiotics muscle blank sample (1) and blank sample spiked with 7 analytes at MRL level (2).

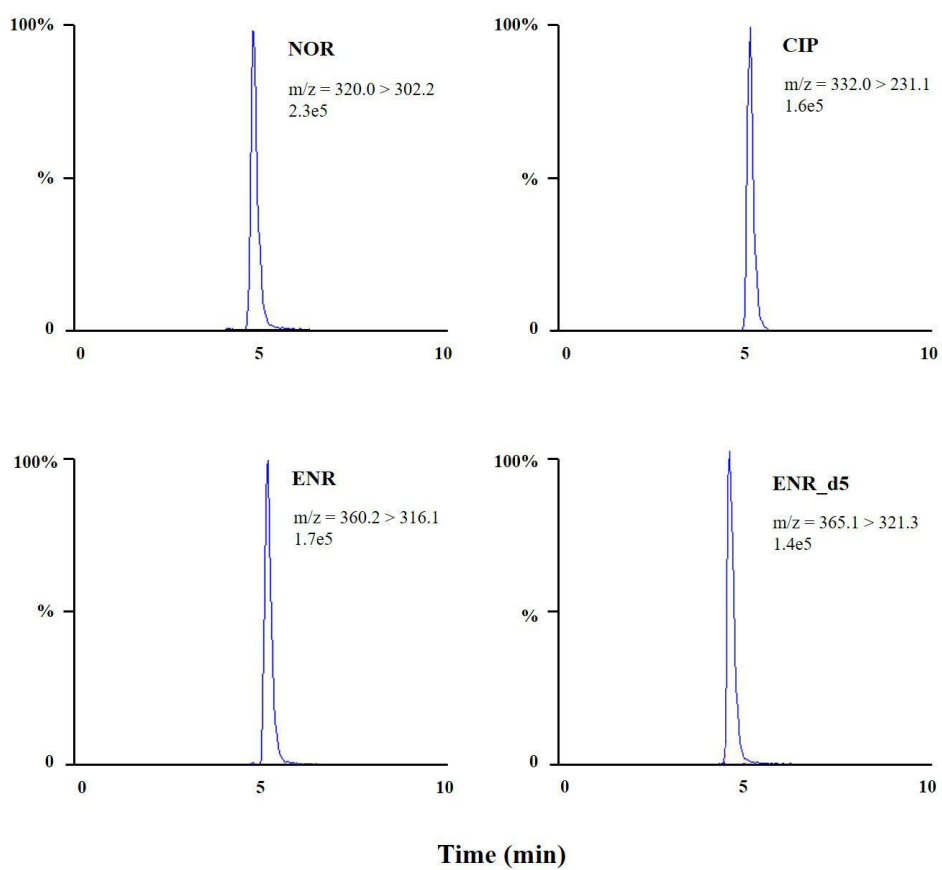


Fig. 2. Extracted ion chromatogram for muscle samples spiked in MRL concentration level for fluoroquinolones.

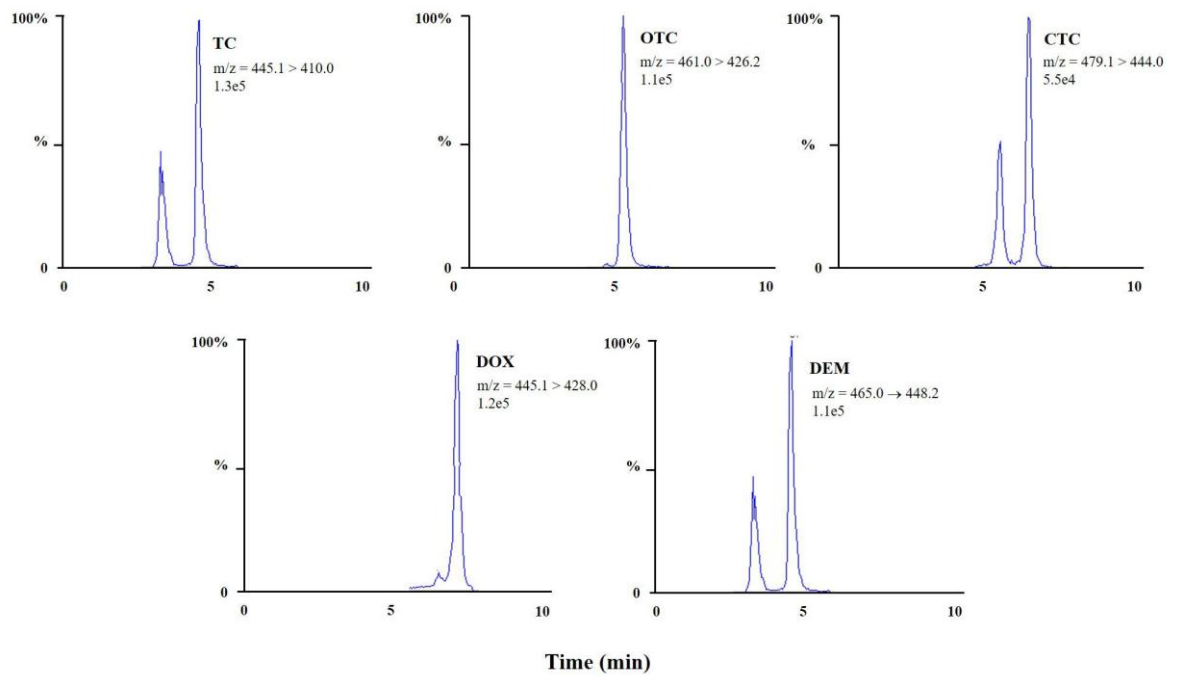


Fig. 3. Extracted ion chromatogram for muscle samples spiked in MRL concentration level for tetracyclines.

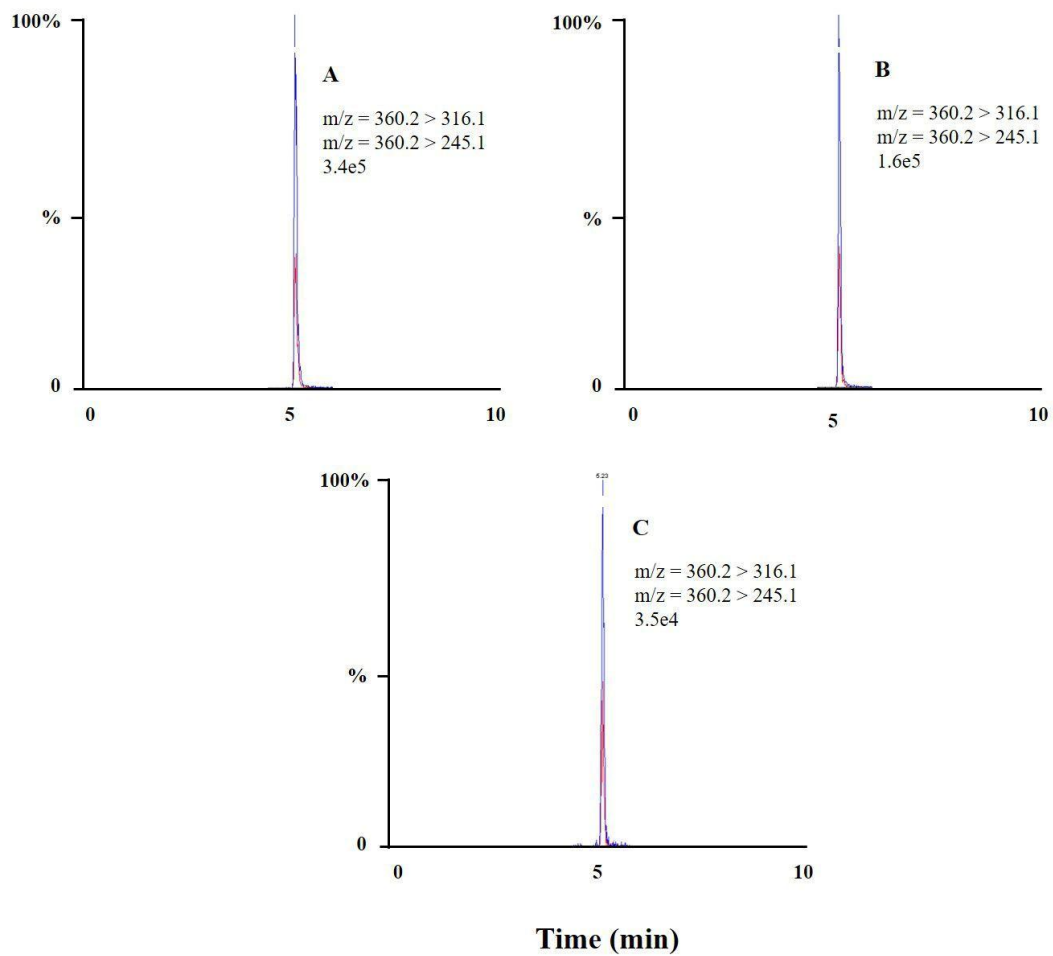


Fig. 4. LC-MS/MS chromatograms for positive samples of enrofloxacin at $45.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ (A), $20.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B) and $15.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (C).

4 CAPÍTULO II

4.1 ARTIGO 2

Chlortetracycline, doxycycline, and oxytetracycline depletion in broiler chicken muscle determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Vanessa Gass da Silveira ^a, Raquel Durand Coelho ^a, Maurício Schneider Oliveira ^a,
Carlos Augusto Mallmann ^{a, *}

De acordo com normas para publicação em: *Food Control*

(Artigo submetido ao periódico *Food Control* – 2016)

^a Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Laboratório de Análises Micotoxicológicas - LAMIC, CEP 97105 900, Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8445.

E-mail address: mallmann@lamic.ufsm.br (C.A. Mallmann).

ABSTRACT

Brazil is among the largest global producers and the largest exporter of chicken meat. Brazilian chicken products have high quality and competitiveness, which have increased domestic consumption and generated high export volumes. The veterinary drugs chlortetracycline, doxycycline, and oxytetracycline are widely used to prevent and treat diseases, and to promote growth in countries where such use is legal. Despite the widespread use of these drugs in Brazil, there are few studies of residual tissue depletion in broiler chickens and analysis of these residues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). We performed a depletion study with broiler chickens that received five consecutive days of orally administered chlortetracycline ($n = 48$), doxycycline ($n = 48$), or oxytetracycline ($n = 48$) at doses of 60, 20, and 60 mg·kg⁻¹ body weight, respectively. Four chickens of each treated group and two chickens for control group were slaughtered at 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, and 240 h after treatment. Muscle samples were collected from each animal and individually stored at -20 °C until sample preparation and chromatographic analysis. The homogenized muscle samples were extracted with acidified acetonitrile, and 150 mM EDTA was added to samples to prevent tetracycline chelation. The final extracts were analyzed by LC-MS/MS. Results showed that chlortetracycline residues were under the maximum residue limit (MRL) considering Brazilian, European Union and Japanese laws after 1 day. For doxycycline, it was found residues below the MRL established by Brazilian and European laws after 3 days and after 5 days according to Japanese laws. For oxytetracycline, this period was of 2 days according to Brazilian and Japanese laws, and 3 days according to European Union law.

Keywords: tetracyclines; antibiotic residues; muscle depletion; withdrawal time; LC-MS/MS.

1. INTRODUCTION

For many years, Brazil has been among the largest global producers and the largest exporter of chicken meat. The quality of Brazilian poultry products is reflected by increased domestic consumption and high export volumes (ABPA, 2015). Antibiotics are routinely used by the poultry industry and poultry veterinarians to enhance growth and feed efficiency and reduce diseases. There are increasing concerns that the use of these drugs in animal production may affect human health by promoting the development of antibiotic-resistant bacteria in animals, which can be transmitted to humans through animal products or through the environment (Donoghue, 2003; Castanon, 2007).

Tetracyclines (TCs) are widely used in the poultry industry. They are added directly to feed or water to prevent and treat diseases and to promote growth in countries where such use is legal (Gustafson & Kiser, 1985; Chopra, Hawkey, & Hinton, 1992; Botsoglou & Fletouris, 2001; Chopra & Roberts, 2001). The use of TCs to promote the growth of broiler chickens has been prohibited since 2009 in Brazil and since 1970 in Europe (Brasil, 2009; European Commission, 1970). Tetracyclines are effective against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Mycoplasma*, *Chlamyphila*, and *Rickettsia* spp. (Bishop, 2001; Botsoglou & Fletouris, 2001). In general, these drugs are absorbed moderately well by the digestive system in mammals, but absorption may be less complete in birds (Anadón et al., 1994; Botsoglou & Fletouris, 2001). The therapeutic use of TCs in food-producing animals must be evaluated not only in terms of good clinical efficacy, but also by considering the risk to consumers of drug residues in edible tissues. Strict legislative frameworks have been established to control the use of antimicrobials and antibiotics, to minimize the risks to human health associated with consumption of these drug residues (Anadón et al., 2012). Maximum residue limits (MRLs) have been established in several countries, and agencies monitor the food supply to ensure that TC residue concentrations do not exceed the MRL levels. Brazil

and Japan have established MRLs of $200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for CTC, OTC, and TC in poultry muscle, whereas the European Union (EU) established an MRL of $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The MRL for DOX is $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in Japan and $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in Brazil and the EU (Brasil, 2014; European Commission, 2009; Ministry of Health, Labour and Welfare, 2014; The Japan Food Chemical Research Foundation, 2016).

To deliver food products that are safe for human consumption, withdrawal times for drugs given to food production animals must be observed (Kukanich et al., 2005). The withdrawal time is considered as the time needed after the completion of treatment for tissue concentrations of the drug and any metabolites to decrease to less than the tolerance value or safe concentration for human consumption (Riviere et al., 1998). Some studies reported adequate times to predict that TC concentrations in chicken muscle were below the MRLs established by the European Union ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$): 5 days for DOX and OTC, and 3 days for CTC (Gustafson & Kiser, 1985; Capolongo et al., 2002; Anadón et al., 1994; 2012).

Despite widespread use of TCs in Brazil, few studies have investigated residual tissue depletion in broiler chickens and analyzed drug residues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The aim of this work was to evaluate the rate of depletion of CTC, DOX, and OTC in healthy chicken muscle after multiple oral administrations of these drugs, and to compare the results with the established standards of Brazilian, EU, and Japanese laws.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals and reagents

Analytical standards of CTC, DOX, OTC, and demeclocycline (DEM) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). The drugs used to treat the animals were purchased

in local stores. Acetonitrile, methanol, and formic acid [high performance liquid chromatography (HPLC) grade] were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q System (Millipore, Bedford, MA USA). Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). After preparation, samples were filtered through a Captiva Premium Syringe Filter Nylon ($0.45\ \mu\text{m}$, Agilent Technologies Inc., USA).

2.2. *Animals*

The procedure of Anadón et al. (1994; 2012) was adapted for this study. A total of 168 Cobb 500 broiler chickens were housed in individual boxes maintained at room temperature with controlled humidity and ad libitum access to water and a drug-free ration to allow complete elimination of any previous antimicrobial treatment. On day 27, the animals were assigned to one of three groups on the basis of individual weight, with 48 animals in each group according to the antibiotic used for the treatment, and with 24 animals in the control group. Starting on day 28, each animal received CTC, DOX, or OTC for 5 consecutive days at doses of 60, 20, and 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight, respectively, which corresponded at treatment doses (Anadón et al., 1994; 2012; Ito, Miyaji, Lima, & Okabayashi, 2005). The average weight of the group was used to calculate the dose of each antibiotic given to each animal. All drugs were administered orally every 24 h, and food was removed during the time of 12 h before to 6 h after drug administration. The antibiotic solutions for oral administration were prepared daily by dissolving each drug in water and storing protected from light. Micropipettes were used to administer the antibiotic directly into the esophagus.

In accordance with the European Agency for Medicines (1995), four chickens of each treated group and two chickens of the control group were slaughtered after sensitization with

carbon dioxide at 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, and 240 h after treatment. Muscle samples (breast) were collected from each animal and individually stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until sample preparation and chromatographic analysis. The study was undertaken in accordance with ethics requirements and authorized by the official ethical committee of Federal University of Santa Maria.

2.3. Sample extraction procedure

The sample extraction procedure was developed by Silveira et al. (2016) (manuscript submitted for publication). Muscle samples were homogenized and triturated using a meat mixer. Then, a $2 \pm 0.1\text{ g}$ aliquot was weighed into a 50 mL polypropylene centrifuge tube. To prevent the chelation of TCs, 400 μL of 150 mM EDTA was added to the samples. Samples were spiked with internal standard solution (DEM), and the controls were spiked with standard solution containing all the analytes, to achieve $0 \times \text{MRL}$, $0.25 \times \text{MRL}$, $0.50 \times \text{MRL}$, $1.0 \times \text{MRL}$, $1.5 \times \text{MRL}$, and $2.0 \times \text{MRL}$. The samples were allowed to stand for 10 min in a dark room at room temperature. Then, 800 μL of water was added, the samples were mixed in a vortex (10 s), and placed in a refrigerator at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Antibiotics were extracted with 6 mL of acetonitrile acidified with 0.1% (v/v) formic acid, samples were mixed in a vortex for 20 min, and then placed in an orbital shaker for 10 min at 180 rpm. The samples were centrifuged at $3,100 \times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the upper layer was transferred into a 15 mL polypropylene centrifuge tube, and then placed in a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer for 1 h. Then, samples were centrifuged at $3,100 \times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the supernatant was transferred into a glass tube, and all solvent was evaporated at $40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ under nitrogen flow. The samples were resuspended with 1 mL of water:methanol [70:30 (v/v)], transferred to a microtube, and

centrifuged at $20,800 \times g$ for 10 min at 4 °C. Finally, the supernatant was filtered through a nylon filter (0.45 μm), and 5 μL was injected into the LC-MS/MS system for analysis.

2.4. Chromatographic and mass spectrometric conditions

Chromatographic analyses were performed using an Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technologies Inc., USA) coupled to a 4000 QTRAP mass spectrometer (SCIEX, Canada) equipped with an electrospray ionization interface (ESI). Instrument control and data processing were performed with Analyst 1.5.1 software. Separation was achieved in a Zorbax SB-C₁₈ LC column (50 \times 4.6 mm, 1.8 μm particle diameter) with a C₁₈ column guard (12.5 \times 4.6 mm, 5 μm particle diameter), both from Agilent Technologies.

The gradient elution was performed using a mobile phase (flow rate at 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) containing water (solvent A) and methanol (solvent B), both acidified with 0.1% formic acid. The gradient elution program was as follows: 0–1 min, isocratic step with 5% B; 1–7.5 min, gradient to 99% B; 7.5–9 min, isocratic step with 99% B; 10 min, returned to initial composition of 5% B.

The ion source-dependent parameters were optimized using the following flow injection analysis approach: curtain gas (CUR) at 15 psi, collision-activated dissociation gas (CAD) was set to medium, source temperature 650 °C, dry gas 1 (GS1) and dry gas 2 (GS2) at 45 psi, and the spray voltage was set to 5,000 V. Detection was performed in positive-ion mode using multiple reaction monitoring (MRM), which monitors two transitions for each analyte. The retention times and compound-dependent parameters of the optimized LC-MS/MS method are presented in Table 1.

2.5. Drug quantification in experimental samples

Polynomial regression analysis of the logarithmically transformed data was used to calculate CTC, DOX, and OTC depletion (Fig. 1). The concentration-time profiles for the muscle tissue samples are presented in Table 2. The regression analysis equation of the matrix-matched calibration curves ($r^2 > 0.99$) was calculated at different concentrations to avoid having to extrapolate the results. The concentration ranges used for the matrix-matched calibration curves were: 0, 10, 20, 50, 100, 200, 300 and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The concentration ranges of the curve used for 24 h post-treatment quantification were: 0, 50, 100, 200, 300, 400 and 600 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. For the samples taken at 6 h after the last dose administered, the second concentration range curve was 0, 50, 100, 200, 300 and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, which was concentrated 10 times and then diluted at the same proportion before injection in the LC-MS/MS system.

2.6. Data analysis

The depletion results were estimated by polynomial regression analysis of log-transformed concentrations detected in chicken muscle. Each value was the mean \pm SD for four broiler chickens. Statistical analyses were performed using the Statgraphics Centurion statistical program (Statgraphics Centurion 15.2.14, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The calibration curves of spiked muscle samples (described in Section 2.5) were linear ($r^2 > 0.99$) and were used for quantification of the drugs in the samples. Residues of CTC, DOX, and OTC were detected in chicken muscle (breast) after oral daily administration. The

drug concentrations in muscle samples at different collection times are presented in Table 2 and Fig. 1.

Mean tissue concentrations of CTC, DOX, and OTC were 1,239.5, 3,420.0, and 1,295.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, at 6 h after the last dose of each drug. The degree of oral absorption of the TCs is a function of the compound lipophilicity. DOX is the most lipophilic compound, and it is the best absorbed (Ito, Miyaji, Lima, & Okabayashi, 2005). The concentrations of all the tested drugs in muscle were initially high, and then declined over time. Doxycycline had the highest concentration at 6 h after the last dose, but the DOX concentration at 48 h after the last dose (130.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) was lower than that of OTC (152.8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The concentrations of antibiotic residues in chicken muscle samples were below the Brazilian MRL at 24 h after the last dose for CTC, at 48 h after the last dose for OTC, and at 72 h after the last dose for DOX (Table 2).

Previous studies have shown that DOX is readily available for distribution to tissues (Anadón et al., 1994; Böcker, Estler, Maywald, & Weber, 1981; Michel, Mosser, & Olle, 1984). In our study, high DOX concentrations were detected in muscle after oral dosing of 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ daily for five consecutive days, substantial concentrations were still detected at 120 h after the last dose, and low concentrations were detected until 240 h after the last dose (Table 2 and Fig. 1). Similar results were reported by Anadón et al. (1994), who treated chicken with DOX at 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ daily for four days. However, this earlier study only evaluated drug depletion for five days after the last dose. Doxycycline is highly lipophilic and is expected to be distributed throughout the muscle tissues in chickens.

Anadón et al. (1994) showed that DOX was eliminated slowly from chicken tissues. Mean DOX concentrations ranging from 28–200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ persisted for 5 days after the last treatment dose. Doxycycline was rapidly, but only partially, absorbed after oral administration. This drug has several important advantages over other TC analogs, including

essentially complete absorption, good tissue penetration, and slower elimination so that only one dose is needed per day (Anadón et al., 1994; Ito, Miyaji, Lima, & Okabayashi, 2005).

Chlortetracycline concentrations were the lowest of all three tested TCs from the beginning of the depletion study up to 240 h after the last dose. The mean CTC concentrations were below the limit of detection (LOD) of our method ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) at 168 h after the last dose. By contrast, it was still possible to detect low concentrations of DOX ($26.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) at 216 h after the last dose and OTC ($22.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) at 240 h after the last dose. The greatest change in the CTC concentration was observed at 6 and 12 h after the last dose ($1,239.5$ and $372.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively). These observations can be explained by the drug pharmacokinetics. In a study of rats who received a single oral dose of $75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight of CTC, plasma concentration declined from $2.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at 6 h after the last dose (Berte & Vandoni, 1962). The administration of CTC at a dose of $10.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight to broiler chickens by oral gavage resulted in a CTC blood level averaging $130 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at 2 h and $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at 6 h after dosing. At 24 h after dosing, the blood CTC levels in the majority of animals was less than $0.015 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Schumacher, 1968).

Gingher (1988) administered $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTC to chickens in their feed for 7 days. On the day of the last dose, liver contained $328 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTC and kidney tissues contained $2,450 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ CTC. Residues were not detected at one day after the last dose. When CTC was not detectable in liver and kidney, CTC residues were absent from all other edible tissues including muscle (Gingher, 1979).

Considerable research has investigated the presence of OTC residues in eggs (Donoghue & Hairston, 1999; Muñoz et al., 2014), milk (Anderson, Moats, Rushing, Wesen, & Papich, 1995; Dinsmore, Stevens, Cattell, Salman, & Sundlof, 1996; Dudrikova, Sokol, Burdova, Turek, & Cabadaj, 1996), as well as fish (Paschoal, Bicudo, Cyrino, Reyes, & Rath, 2011), calf (Mawhinney, Oakenfull, & Nicholls, 1996), turkey (Capolongo et al., 2002),

swine and sheep tissues (Nouws, Smulders, & Rappalini, 1990). However, recent data are not available for OTC residues in chicken tissues. In our study, we detected OTC residues less than the MRL established by Brazilian legislation ($200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) at 48 h after the last dose. We could detect low OTC concentrations until 240 h after the last dose (Table 2). Capolongo et al. (2002) administrated $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ OTC to turkeys for 3 days in their drinking water, and measured the residues by liquid chromatography with UV detection. The results showed that OTC residues were detected at very low concentrations in muscle tissue at one day after the last dose, and residues were far lower than the EU MRL values at three days after the last dose. These results may differ from the earlier study due to the higher sensitivity of our quantization method (LC-MS/MS), which can detect very low drug concentrations.

4. CONCLUSIONS

Our data support more prudent use of CTC, DOX, and OTC for treatment of chickens. We suggest a dose of $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight for CTC and OTC, and $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight for DOX, orally administrated for five consecutive days. Chlortetracycline residues were under the MRL considering Brazilian, European and Japanese laws after one day. For DOX, it was found residues below the MRL established by Brazilian and European Union laws after three days and after five days according Japanese laws. For OTC this period was of two days according to Brazilian and Japanese laws, and three days according to European Union law. This work presents an analysis of veterinary antibiotic depletion studies in broiler chickens, and contributes to food safety for consumers.

Acknowledgments

This work was performed and partly financed by Laboratório de Análises Micotoxicológicas in Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM) as part of the doctoral thesis of the first author. We would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior (CAPES), for granting a scholarship to the first author. The authors are grateful to BioMed Proofreading for the manuscript English review.

REFERENCES

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. (2015). 2015 Annual Report. Retrieved from: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Accessed in: 17 dec. 2015.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Díaz, M. J., Bringas, P., Fernandez, M. C., Fernandez-Cruz, M. L., Iturbe, J., & Martínez, M. A. (1994). Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens. *Avian Pathology*, 23, 79–90. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03079459408418976>>. Accessed in: 21 dec. 2015. DOI: 10.1080/03079459408418976.
- Anadón, A., Gamboa F., Martínez, M. A., Castellano, V., Martínez, M., Ares, I., Ramos, E., Suarez, F. H., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2012). Plasma disposition and tissue depletion of chlortetracycline in the food producing animals, chickens for fattening. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2714–2721. Retrieved from: <<https://www.researchgate.net/publication/2249>

77216_Plasma_disposition_and_tissue_depletion_of_chlortetracycline_in_the_food_producin
g_animals_chickens_for_fattening>. Accessed in: 20 dec. 2015. DOI:
10.1016/j.fct.2012.05.007.

Anderson, K. L., Moats, W. A., Rushing, J. E., Wesen, D. P., & Papich, M. G. (1995).
Potential for oxytetracycline administration by three routes to cause milk residues in lactating
cows, as detected by radioimmunoassay (Charm II) and high-performance liquid
chromatography test methods. *American Journal of Veterinary Research*, 56(1), 70–77.
Retrieved from: <[http://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0028869578&origin
=inward&txGid=0#](http://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0028869578&origin=inward&txGid=0#)>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Berte, F., & Vandoni, G. (1962). *Chemotherapia*, 5, 219-230. In: FAO – Food and
Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in foods
and animals. Retrieved from: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/vetdrug/41-8-chlortetracycline.pdf>
>. Accessed in: 09 jan. 2016.

Bishop, Y. (2001). *The Veterinary Formulary*. (5th ed). London: Pharmaceutical Press, (692
p).

Botsoglou, N. A., & Fletouris, D. J. (2001). *Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food
Safety, and Analysis*. New York: Marcel Dekker, (1154 p).

Böcker, R., Estler, C. J., Maywald, M., & Weber, D. (1981). Comparison of distribution of
doxycycline in mice after oral and intravenous application measured by a high-performance

liquid chromatographic method. *Arzneimittel-Forschung*, 31(12), 2116-2117. Retrieved from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7199309>>. Accessed in: 15 dec. 2015.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009). Instrução Normativa no 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Retrieved from: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2026-2009%20-%20Reg%20T%C3%A9cniconormas%20fabrica%C3%A7%C3%A3o%20emprego%20antimicrobianos%20uso%20vet.pdf>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA No 11, de 07 de Maio de 2014*. Retrieved from: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2011%20-%20PNCRB%202014.pdf>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Capolongo, F., Santi, A., Tomasi, L., Anfossi, P., Missagia, M., & Montesissa, C. (2002). Residues of oxytetracycline and its 4'-epimer in edible tissues from turkeys. *Journal of AOAC International*, 85(1), 8-14. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/11483477_Residues_of_oxytetracycline_and_its_4%27-epimer_in_edible_tissues_from_turkeys>. Accessed in: 21 dec. 2015.

Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86(11), 2466-2471. Retrieved from: <<http://ps.fass.org/content/86/11/2466.full.pdf>>. Accessed in: 06 jan. 2016. DOI:10.3382/ps.2007-00249.

Chopra, I., Hawkey, P. M., & Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(3), 245-277. Retrieved from: <<http://mmbbr.asm.org/content/65/2/232.full.pdf+html>>. Accessed in: 05 jan. 2016. DOI: 10.1093/jac/29.3.245.

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232–260. Retrieved from: <<http://mmbbr.asm.org/content/65/2/232.full.pdf+html>>. Accessed in: 05 jan. 2016. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232–260.2001.

Cunha, B. A., Domenico, P., & Cunha, C. B. (2000). Pharmacodynamics of doxycycline. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(5), 270-273. Retrieved from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-0691.2000.00058-2.x/full>>. Accessed in: 03 jan. 2016. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2000.00058-2.x.

Dinsmore, R. P., Stevens, R. D., Cattell, M. B., Salman, M. D., & Sundlof, S. F. (1996). Oxytetracycline residues in milk after intrauterine treatment of cows with retained fetal membranes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209, 1753-1755. Retrieved from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8921036>>. Accessed in: 03 jan. 2016.

Donoghue, D. J., & Hairston, H. (1999). Oxytetracycline transfer into chicken egg yolk or albumen. *Poultry Science*, 78(3), 343–345. Retrieved from: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/78/3/343.full.pdf+html>>. Accessed in: 03 jan. 2016. DOI: 10.1093/ps/78.3.343.

Donoghue, D. J. (2003). Antibiotic Residues in Poultry Tissues and Eggs: Human Health Concerns? *Poultry Science*, 82(4), 618-621. Retrieved from: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/82/4/618.full.pdf+html>>. Accessed in: 28 dez. 2015. DOI: 10.1093/ps/82.4.618.

Dudrikova, E., Sokol, J., Burdova, O., Turek, P., & Cabadaj, R. (1996). Oxytetracycline in the milk of dairy cows with clinical signs of mastitis during the lactation period. *Veterinary Medicine – Praha*, 41(11), 329-333. Retrieved from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036618>>. Accessed in: 03 jan. 2016.

European Agency for Medicines. (1995). *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for guidance: approach towards harmonization of withdrawal periods. EMEA/CVMP/036/95*. European Agency for Medicines and Committee for Veterinary Medicinal Products, London, 1-37. Retrieved from: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004428.pdf>. Accessed in: 04 jan. 2016.

European Commission. (1970). Council Directive of 23 November 1970, (70/524/EEC), concerning additives in feeding-stuffs. *Official journal of the European Communities*, L270/1, 840-856. Retrieved from: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31970L0524&from=en>>. Accessed in: 04 jan. 2016.

European Commission. (2009). Commission Regulation No. 37/2010 of 22 December 2009. (37/2010/EC), on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Union*, L15/2, 1-72. Retrieved from: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>. Accessed in: 03 jan. 2016.

Gingher, P. E. (1979). *American Cyanamid Company Report FD 27: 600-670, Experiment A-78-9b*. In: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. Retrieved from: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/vetdrug/41-8-chlortetracycline.pdf>>. Accessed in: 09 jan. 2016.

Gingher, P. E. (1988). American Cyanamid Company Report FD 36: (a) Report No. 106. Experiment A-87-39, (b) American Cyanamid Company Report FD 36: (a) Report No. 123. Experiment A-88-7. In: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. Retrieved from: <<http://www.fao.org/docrep/w4601e/w4601e05.htm>>. Accessed in: 09 jan. 2016.

Gustafson, R. H., & Kiser, J. S. (1985). Nonmedical Uses of the Tetracyclines. In Hlavka, J. J., & Boothe, J. H. (Eds.), *The Tetracyclines (Handbook of Experimental Pharmacology)* (Chapter 8), 78. Berlin: Springer-Verlag.

Ito, N. M. K., Miyaji, C. I., Lima, E. A., & Okabayashi, S. (2005). Antimicrobianos: usos preventivos e curativos na avicultura. In J. Palermo Neto, H. Spinosa, & S. L. Górniak (Eds.), *Farmacologia Aplicada à Avicultura* (pp. 115-147). (1th ed.). São Paulo: Roca, (Chapter 8).

Kukanich, B., Gehring, R., Webb, A., Craigmill, A., & Riviere, J. E. (2005). Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 1574–1577. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/7456060_Effect_of_formulation_and_route_of_administration_on_tissue_residues_and_withdrawal_times>. Accessed in: 27 dec. 2015. DOI: 10.2460/javma.2005.227.1574.

Mawhinney, H., Oakenfull, S. M., & Nicholls, T. J. (1996). Residues from long-acting antimicrobial preparations in injection sites in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 74(2), 140–142. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/14312982_Residues_from_long-acting_antimicrobial_preparations_in_injection_sites_in_cattle>. Accessed in: 22 dec. 2015. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1996.tb14816.x.

Michel, G., Mosser, J., & Olle, J. (1984). Pharmacokinetics and tissue localization of doxycycline polyphosphate and doxycycline hydrochloride in the rat. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 9(2), 149-153. Retrieved from: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF03189618>>. Accessed in: 28 dec. 2015. DOI: 10.1007/BF03189618.

Ministry of Health, Labour and Welfare. Department of Food Safety, Japan. (2014). *Revision of the Standards and Specifications for Foods and Food Additives under the Food Sanitation Act (revision of agricultural chemical residue standards)*. Retrieved from: <https://members.wto.org/crnattachments/2014/sps/JPN/14_3181_00_e.pdf>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Muñoz, R. Cornejo, J., Maddaleno, A., Araya-Jorda, C., Iragüen, D. Pizarro, N., & San Martín, B. (2014). Withdrawal times of oxytetracycline and tylosin in eggs of laying hens after oral administration. *Journal of Food Protection*, 77(6), 1017–1021. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/262582061-Withdrawal_Times_of_Oxytetracycline_and_Tylosin_in_Eggs_of_Laying_Hens_after_Oral_Administration>. Accessed in: 18 dec. 2015. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-13-440.

Nouws, J. F., Smulders, A., & Rappalini, M. (1990). A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves,

pigs and sheep. *Vet. Q.* 12(3), 129–138. Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.1990.9694257>>. Accessed in: 05 jan. 2016. DOI: 10.1080/01652176.1990.9694257.

Paschoal, J. A. R., Bicudo, Á. J. A., Cyrino, J. E. P., Reyes, F. G. R., & Rath, S. (2011). Depletion study and estimation of the withdrawal period for oxytetracycline in tilapia cultured in Brazil. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35, 90–96. Retrieved from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2011.01294.x/pdf>>. Accessed in: 15 dec. 2015. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2011.01294.x.

Riviere, J. E., Webb, A. I., & Craigmill, A. L. (1998). Primer on estimating withdrawal times after extralabel drug use. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213, 966–968.

Schumacher, W. E. (1968). *American Cyanamid Company Report* FD 16: 352-378. Experiment A-67-36-FT. In: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. Retrieved from: <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/vetdrug/41-8-chlortetracycline.pdf>>. Accessed in: 13 dec. 2015.

The Japan Food Chemical Research Foundation. (2016). *Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods*. Retrieved from: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=43400>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Table 1.
Mass spectrometry conditions and retention times for selected compounds.

Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>) [M+H]⁺	Product ions (<i>m/z</i>)^a	Declustering potential (V)	Collision energy (V)^a	Cell exit potential (V)^a	Retention time (min)
CTC	461.1	426.2/201.1	56	29/59	12/10	5.81
DOX	445.1	428.0/267.0	66	37/49	10/14	6.34
OTC	479.1	444.0/462.0	61	33/30	24/12	5.06
DEM	465.0	448.2/154.0	61	27/43	12/10	5.38

^aNumerical values are given in the order quantifier/qualifier ion.

Table 2.

Muscle concentration of chlortetracycline (CTC), doxycycline (DOX) and oxytetracycline (OTC) for broiler chickens treated orally with each these drugs at the rate of 60, 20 and 60 mg kg⁻¹ body weight, respectively, for five consecutive days^a.

Time after the last dose (h)	Residues (µg kg ⁻¹)		
	CTC	DOX	OTC
6	1,239.5 ± 759.3	3,420.0 ± 987.4	1,295.0 ± 167.4
12	372.0 ± 114.5	2,125.0 ± 408.5	1,017.8 ± 159.6
24	96.1 ± 42.2	493.0 ± 202.6	326.0 ± 74.3
48	38.8 ± 11.3	130.3 ± 17.5	152.8 ± 25.1
72	38.0 ± 18.1	60.9 ± 12.3	95.5 ± 16.5
96	21.2 ± 5.8	57.5 ± 16.0	46.8 ± 23.8
120	20.2 ± 15.2	45.7 ± 16.0	45.4 ± 2.3
144	<LOQ ^b	27.3 ± 15.1	38.3 ± 7.4
168	<LOD ^c	37.4 ± 19.0	35.9 ± 7.4
192	<LOD ^c	26.9 ± 5.8	25.0 ± 3.8
216	<LOD ^c	26.4 ± 6.3	24.4 ± 1.6
240	<LOD ^c	<LOQ ^b	22.4 ± 5.4

^a Each value is the mean ± SD for 4 broiler chickens.

^b LOQ (limit of detection) equivalent to 20 µg kg⁻¹.

^c LOD (limit of detection) equivalent to 10 µg kg⁻¹.

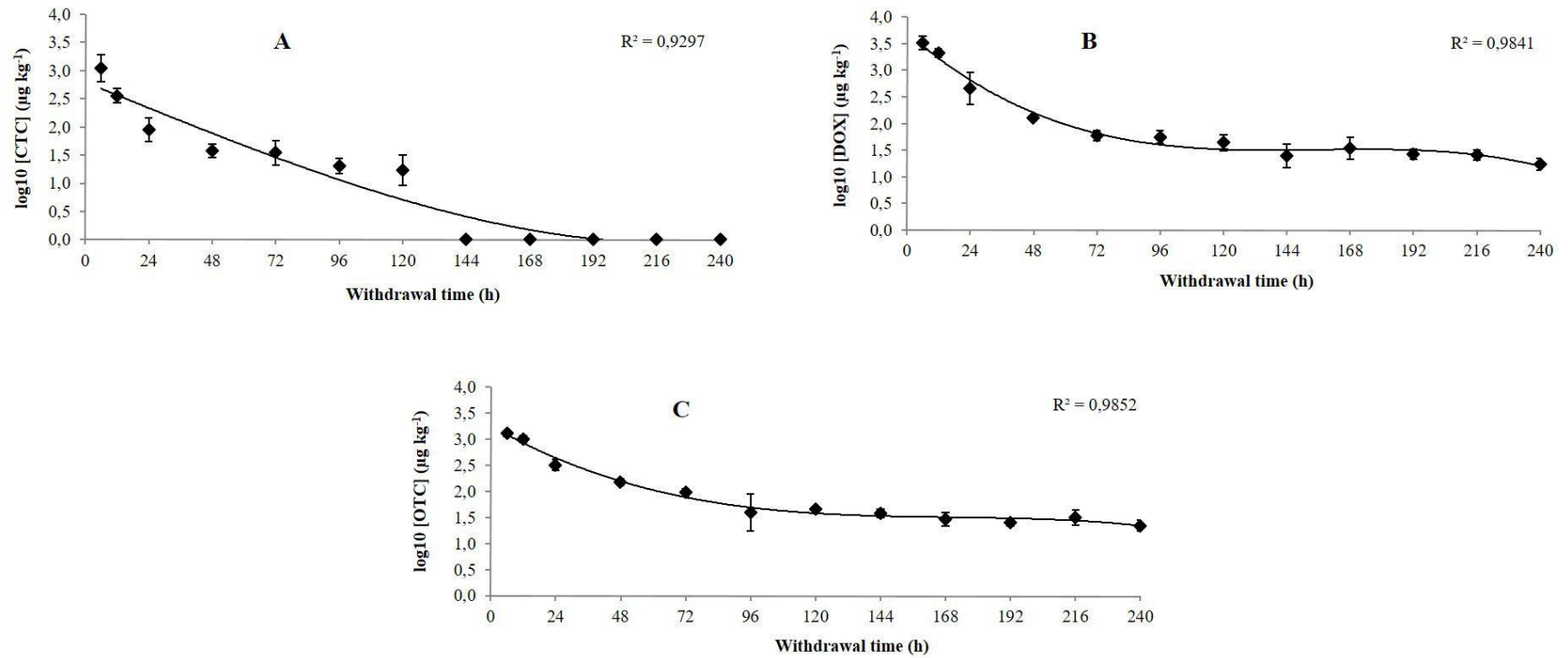


Fig. 1. Mean of concentrations of chlortetracycline (A), doxycycline (B) and oxytetracycline (C) in chicken muscle samples. Data represent mean \pm SD values for 4 broiler chickens.

5 CAPÍTULO III

5.1 ARTIGO 3

Depletion study of enrofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Vanessa Gass da Silveira ^a, Raquel Durand Coelho ^a, Maurício Schneider Oliveira ^a,
Adriano Olnei Mallmann ^a, Carlos Augusto Mallmann ^{a,*}

De acordo com normas para publicação em: *Food Control*.

(Artigo a ser submetido ao periódico *Food Control* – 2016)

^a Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Laboratório de Análises Micotoxicológicas - LAMIC, CEP 97105 900, Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8445.

E-mail address: mallmann@lamic.ufsm.br (C.A. Mallmann).

ABSTRACT

To ensure delivery of safe foods to consumer, withdrawal times for drugs must be respected according to the maximum residual limits established by regulatory agencies. Fluoroquinolones are a class of antibiotics widely used in human medicine and veterinary practice and very few depletion studies in broiler chickens and analysis of its residues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have been carried out. Therefore, we realized a depletion study of enrofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in broiler chicken and we suggested an appropriate withdrawal time for muscle. A depletion study was performed with broiler chickens treated orally with ciprofloxacin (n = 48), enrofloxacin (n = 48) and norfloxacin (n = 48) (respectively, 10, 10 and 15 mg kg⁻¹ body weight) for 3 consecutive days. Four chickens of each treated group and 2 of control group were slaughtered at 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h after treatment. Muscle was collected from each animal and individually stored at -20 °C until sample preparation and chromatographic analysis. The homogenized muscle samples were extracted with acidified acetonitrile and the final extracts were analysed by LC-MS/MS. The results showed that it is possible to detect small concentration of this drugs in muscle samples. It was possible to detect low levels of enrofloxacin until 9 days after the last dose, which would make it difficult the exportation of this chicken meat to the United States and Canada. One day of withdrawal time was enough to ciprofloxacin residues are below the MRL established by Brazilian, European and Japanese legislations (100 µg kg⁻¹) and 4 days to United States and Canada legislations (zero tolerance). For norfloxacin, the withdrawal time was 1 day for all mentioned countries. The results of this work collaborate with the search of food safety to consumers, as well as for use analytical methods that can be applied in the determination of residual drugs used for depletion studies with broiler chickens.

Keywords: fluoroquinolones, withdrawal time, muscle depletion, LC-MS/MS.

1. INTRODUCTION

Brazil is among the largest global producers and the largest exporter of chicken meat. The quality and competitiveness of Brazilian poultry products are proven by the increase in domestic consumption and by the high exports volumes (ABPA, 2015).

Antimicrobials are frequently used in animal production all over the world for prevention and treatment of diseases, as well for growth promotion. There is an increasing concern that the use of these drugs in veterinary medicine, and particularly in animal production, may implicate human health through the selection of resistant bacteria in animals and their transmission to humans through animal foods and dissipation in the environment (Castanon, 2007).

Fluoroquinolones (FQs) are antibiotics widely used in the treatment of infections in human medicine and in veterinary practice, mainly due their low price, broad spectrum and low metabolization in the body (Bogialli, D'Ascenzo, Di Corcia, Laganà, & Nicolardi, 2008; Kelly et al., 2004; Kemper, 2008; Martinez, McDermonntt, & Walker, 2006; Stolker, Zuidema, Nielen, & Nielen, 2007). In poultry, they are used mainly for the control of early mortality and for the prophylaxis and treatment of respiratory, renal and digestive infections (Martinez, McDermonntt, & Walker, 2006).

Enrofloxacin (ENR) is a FQ that was developed exclusively for veterinary use in cattle, pigs, dogs, cats and for the treatment of respiratory and intestinal diseases in chicken and turkeys (Anderson, Nelson, Rossiter, & Angulo, 2003; Sharma, Jain, & Jain, 2009). Ciprofloxacin (CIP) is one of the metabolites of ENR, pharmacokinetically different, with half or less than half the bioavailability in the body of poultry, and is employed in human medicine therapeutics (Ito, Miyaji, Lima, & Okabayashi, 2005). Norfloxacin (NOR) is widely used in human medicine and veterinary practice, because has broad spectrum and low cost (FAO/WHO/OIE, 2008). A study found that in a certain region of Brazil, ENR, CIP and NOR

were cited among the main drugs employed with purpose preventive and therapy in different development stages of broiler chickens (Brasil, 2005).

European Union (EU) and Brazil have been established maximum residue limits (MRLs) of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the sum of ENR and its metabolite CIP for muscle and other target tissues from poultry (Brasil, 2014; European Commission, 2009). Japan, on the other hand, has established lower MRLs ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006; The Japan Food Chemical Research Foundation, 2016a). In the United States and Canada, the use of FQs was prohibited for chickens after the US Food and Drug Administration's (FDA) decision to withdraw based on a risk assessment of human consumption of chicken contaminated with fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* spp. (Agunos, Léger, & Carson, 2012; FDA, 2005).

Norfloxacin has no MRL established by Brazilian legislation and neither by the EU. However, in Japan, where this drug is allowed, the MRL in chicken muscle is $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (The Japan Food Chemical Research Foundation, 2016b).

Very few studies about depletion of FQs in broiler chickens and analysis of its residues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have been carried out. Therefore, we understand the importance to detect residues of these antibiotics using sensitive, selective and efficient analytical methodologies as LC-MS/MS, as well as determine an appropriate withdrawal time through a depletion study of ENR, CIP and NOR in chicken muscle.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals and reagents

Analytical standards of CIP, ENR, NOR and enrofloxacin_d5 (ENR_d5) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US). The drugs used to treat the animals were purchased in local stores. Acetonitrile, methanol and formic acid (HPLC grade) were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q System (Millipore, Bedford, MA USA). After preparation, samples were filtered through Captiva Premium Syringe Filter Nylon (0.45 μm , Agilent Technologies Inc., USA).

2.2 Animals

The procedure was adapted of San Martín et al. (2007) and Anadón et al. (2012). A total of 168 Cobb 500 broiler chickens, were housed in individual cages maintained at room with temperature and humidity controlled and ad libitum access to water and a drug-free ration to allow complete elimination of any previous antimicrobial treatment.

On day 29, the animals were divided considering the individual weight into 3 groups with 48 animals each, according with the antibiotic used in the treatment, more the control group ($n = 24$). At 30 days, each animal received, for three consecutive days, CIP, ENR and NOR (respectively, 10, 10 e 15 mg kg^{-1} body weight), , which corresponded at treatment doses (Ito, Miyaji, Lima, & Okabayashi, 2005). It was considered, the average weight of the group to calculate the dose of each antibiotic applied to each animal. All drugs were administered orally every 24 hours and food was remove from 12 h before until 6 h after drug administration. Micropipettes were used to administer the antibiotic directly in the esophagus.

In accordance with the European Agency for Medicines (1995), four chickens of each treated group and two of control group were slaughtered after sensitization with carbon dioxide at 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h after treatment. Muscle (breast) were collected from each animal and individually stored at -20 °C until sample preparation and chromatographic analysis.

The study was undertaken in accordance with the ethics requirements and authorized by the official ethical committee of Federal University of Santa Maria.

2.3. Sample extraction procedure

The sample extraction procedure was developed by Silveira et al. (2016) (manuscript submitted for publication). Muscle samples were triturated and homogenized using a meat mixer and an aliquot of 2 ± 0.1 g was weighted into a 50 mL polypropylene centrifuge tube. Samples were spiked with internal standard solution (ENR_d5) and the controls with standard solution containing all the analytes to achieve $0 \times \text{MRL}$, $0.25 \times \text{MRL}$, $0.50 \times \text{MRL}$, $1.0 \times \text{MRL}$, $1.5 \times \text{MRL}$ and $2.0 \times \text{MRL}$. The samples were allowed to stand for 10 min in a dark room at room temperature. Then, 800 μL of water was added, the samples were mixed in a vortex (10 s), and placed in a refrigerator at 4 °C for 30 min. Antibiotics were extracted with 6 mL of acetonitrile acidified with 0.1% (v/v) formic acid, samples were mixed in a vortex for 20 min, and then placed in an orbital shaker for 10 min at 180 rpm. The samples were centrifuged at $3,100 \times g$ for 10 min at 4 °C, the upper layer was transferred into a 15 mL polypropylene centrifuge tube, and then placed in a -20 °C freezer for 1 h. Then, samples were centrifuged at $3,100 \times g$ for 10 min at 4 °C, the supernatant was transferred into a glass tube, and all solvent was evaporated at 40 ± 2 °C under nitrogen flow. The samples were resuspended with 1 mL of water:methanol [70:30 (v/v)], transferred to a microtube, and

centrifuged at $20,800 \times g$ for 10 min at 4 °C. Finally, the supernatant was filtered through a nylon filter (0.45 μm), and 5 μL was injected into the LC-MS/MS system for analysis.

2.4. Chromatographic and mass spectrometric conditions

Chromatographic analyses were performed by a HPLC Agilent 1200 series (Agilent Technologies Inc., USA) coupled to 4000 QTRAP mass spectrometer (Sciex, Canada) equipped with an electrospray ionization interface (ESI). Instrument control and data processing were carried out by Analyst 1.5.1 software. Separation was achieved in a Zorbax SB-C₁₈ LC column (50 x 4.6 mm; 1.8 μm particle diameter) with a C₁₈ column guard (12.5 x 4.6 mm; 5 μm particle diameter), both from Agilent Technologies.

The gradient elution was performed using a mobile phase (flow rate at 1 mL min⁻¹) constituted by water (A) and methanol (B), both acidified with 0.1% formic acid. The gradient elution program used was: 0-1 min isocratic step 5% B; 1-7.5 min to 99% B; 7.5-9 min isocratic step 99% B; returned to initial composition 5% B at 10 min.

The ion source-dependent parameters were optimized using flow injection analysis approach: curtain gas (CUR) 15 psi; collision-activated dissociation gas (CAD) was set to medium; source temperature 650 °C; dry gas 1 (GS1) and dry gas 2 (GS2) 45 psi, and the spray voltage was set to 5000 V. Detection was performed in a positive ion mode, using multiple reaction monitoring (MRM), by monitoring two transitions for each analyte. The retention times and compound-dependent parameters of the optimized LC-MS/MS method are demonstrated in Table 1.

2.5. Drug quantification in experimental samples

Polynomial regression analysis of the logarithmic transformed data can be considered for the calculation of CIP, ENR plus CIP and NOR depletion (Fig. 1). The tissue concentration-time profiles are presented in Table 2. The regression analysis equation of the matrix-matched calibration curves ($r^2 > 0.99$) was calculated at different concentrations to avoid having to extrapolate the results. The range of concentrations of the matrix matched calibration curves were: 0–2–5–10–20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 25–50–100–150–200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The range of the curve used for the quantification of 48 h post-treatment was 0–5–10–20–25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 50–100–150–200–250–300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For 24 and 12 h post-treatment samples, were used two curves: 0–25–50–100–150–200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 100–150–200–250–300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentrated 10 times and after diluted in the same proportion. For samples 6 h, the second range curve was 100–150–200–300–400–600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the concentration and dilution were 20 times.

2.6. Data analysis

The depletion results were estimated by polynomial regression analysis of log transformed chicken muscle concentrations. Each value was the mean \pm SD for 4 broiler chickens. It was considered the Statistical analysis was performed using the Statgraphics Centurion computer statistical program (Statgraphics Centurion 15.2.14, Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The calibration curves of spiked muscle samples (described in Section 2.5) were linear ($r^2 > 0.99$) and were used for quantification of the drugs in the samples. Ciprofloxacin, ENR

plus CIP and NOR concentrations in muscle at different sample collection times are shown in Table 2 and Fig. 1.

Ciprofloxacin was evaluated in two ways. One of this it was because this drug is the main metabolite generated from ENR biotransformation and it has antibacterial activity and is currently used in human medicine for the treatment of bacterial infections (Aydemir, Tunger, & Cilli, 2006; Hickerson & Carson, 2006). Therefore, residues of ENR and CIP must be considered together in depletion studies (European Agency for Medicines, 1995). The second way was through direct oral administration of CIP into chickens, since this drug is used in veterinary practice in Brazil.

In our work, in animals treated with CIP by three consecutive days, it was possible to verify that the time necessary to reach residual concentrations lower than MRL established by Brazilian Legislation was 24 h after the last dose. Enrofloxacin and its metabolite CIP concentrations were high initially, then decreased over time. Concentration lower than MRL was found at 72 h after the end of treatment.

Similar results were found by other authors. Oral treatment with ENR and supercritical fluid extraction combined with liquid chromatographic analysis, showed that the concentration of ENR in chicken muscles decreased continuously with time, giving a negligible concentration 72 h after the treatment (Shim, Shen, Kim, Lee, & Kim, 2003). San Martín et al. (2007) showed that the time necessary to reach ENR plus CIP residual concentrations lower than MRLs established by the EU were 96 h for muscle plus skin of white Leghorn hens.

A pharmacokinetic study demonstrated that ENR and CIP are widely distributed in chickens throughout the body but CIP remains for less time. This characteristic of CIP can suggest, in this case, the advantage of a shorter withdrawal time for food producing animals treated with this antimicrobial (Ovando et al., 1999). In our study, a much lower concentration

of CIP was found 6 h after the last dose and it remained in muscle for a shorter time than ENR.

If the legislation of the United States and Canada for ENR and its metabolite CIP are considered, i.e. zero tolerance, the samples analyzed in this study could not be used for consumption in the mentioned countries. This is due to the fact that we found residues of 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ to 216 h after the last dose. Moreover, in Japan, the second largest importer of Brazilian chicken, whose legislation permits a MRL of 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ to ENR plus CIP, this product could be consumed, provided that they comply with withdrawal time of at least 72 h, according to our study.

Anadón et al. (1995) determined residues concentrations of ENR and the metabolite CIP of chickens treated orally with 10 mg kg^{-1} of ENR by 4 days. The results showed that the residues were eliminated slowly. The mean values ranging between 20 to 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in muscle, liver, and kidney and persisted on day 12 after dosing. However, at the time of slaughter (12 days), ENR residues were only detected in liver. Therefore, the authors suggested a withdrawal time of 12 days.

Norfloxacin has not yet MRL established by the legislation of Brazil, United States, Canada and even the EU. However, if we consider the same limit of the other FQs studied in this work, the time required to find residual concentrations lower than MRL would be 24 h after the last dose (Table 2). Although Japanese legislation have a MRL established at a much lower concentration (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), the same time is necessary to reach residual concentrations lower than MRL. In Table 2 we can see that there was a rapid decrease of NOR concentration between 12 and 24 h (386.8 and 19.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively). In a study conducted by Díaz et al. (2001) in swine after administration of 18 mg kg^{-1} of NOR for 5 consecutive days, it was found that their residues persisted for 96 hours in muscle and 24 hours in plasma.

4. CONCLUSIONS

The results demonstrated that the ENR withdrawal time should be extended to attend the current MRL established by United States and Canada. On the other hand, the laws of Brazil, Japan and the EU are more tolerant. As chicken meat is very consumed worldwide, and the FQs are widely used in human medicine, is highly important to established more rigorous criteria to define the values of MRL in broiler chickens.

Acknowledgments

This work was performed and partly financed by Laboratório de Análises Micotoxicológicas in Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM) as part of the doctoral thesis of the first author. We would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior (CAPES), for granting a scholarship to the first author.

REFERENCES

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal (2015). 2015Annual Report. Retrieved from: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Accessed in: 12 dec. 2015.
- Agunos, A., Léger, D., & Carson, C. (2012). Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 53(12), 1289–1300. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500121/pdf/cvj_12_1289.pdf>. Accessed in: 03 jan. 2016.

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Díaz, M. J., Bringas, P., Martínez, M. A., Fernández-Cruz, M. L., Fernández, M. C., Fernández, R. (1995). Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 56(4), 501-516. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/15413027_Pharmacokinetics_and_residues_of_enrofloxacin_in_chickens>. Accessed in: 02 dec. 2015.

Anadón, A., Gamboa F., Martínez, M. A., Castellano, V., Martínez, M., Ares, I., Ramos, E., Suarez, F. H., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2012). Plasma disposition and tissue depletion of chlortetracycline in the food producing animals, chickens for fattening. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2714–2721. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512003389>>. Accessed in: 03 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2012.05.007.

Anderson, A. D., Nelson, J. M., Rossiter, S., & Angulo, F. J. (2003) Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9(4), 373–379. Retrieved from: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/107662903322762815>>. Accessed in: 05 jan. 2016. DOI:10.1089/107662903322762815.

Aydemyr, S., Tunger, A., & Cilli, F. (2006). In vitro activity of fluoroquinolones against common respiratory pathogens. *West Indian Medical Journal*, 55(1), 9-12. Retrieved from: <<http://caribbean.scielo.org/pdf/wimj/v55n1/a03v55n1.pdf>>. Accessed in: 28 dec. 2015.

Bogialli, S., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Laganà, A., & Nicolardi, S. (2008). A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. *Food Chemistry*, 108, 354–360. Retrieved from: <<http://opensample.info/order/556701f24b1797e92d7b7fcee6476d6f967>>

ecac1>. Accessed in: 05 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.044.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA nº 11, de 07 de maio de 2014*. Diário Oficial da União, Seção 1, p. 5.

Brasil. Ministério da Saúde. (2005). *Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVET/PR). Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte*, 23p. Retrieved from: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86(11), 2466-2471. Retrieved from: <<http://ps.fass.org/content/86/11/2466.full.pdf>>. Accessed in: 06 jan. 2016. DOI:10.3382/ps.2007-00249.

Díaz, D., Picco, E. J., Encinas, T., Rubio, M., Litterio, N.J., & Boggio, J. C. (2001). Resíduos tisulares de nicotinato de norfloxacin administrado por vía oral en cerdos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 33(1). Retrieved from: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2001000100004>>. Accessed in: 05 jan. 2016. DOI: 10.4067/S0301-732X2001000100004.

European Agency for Medicines. (1995). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for guidance: approach towards harmonization of withdrawal periods. EMEA/CVMP/036/95. European Agency for Medicines and Committee for Veterinary Medicinal Products, London, 1-37. Retrieved from: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004428.pdf>. Accessed in: 17 dec. 2015.

European Commission. (2009). Commission Regulation No. 37/2010 of 22 December 2009, (37/2010/EC), on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Union*, L15/2, 1-72. Retrieved from: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>. Accessed in: 17 dec. 2015.

FAO/WHO/OIE. (2008). Report of the Joint FAO/WHO/OIE. Expert meeting on critically important antimicrobials. FAO Headquarters, Rome, 26-30 November 2007. *Food and Agriculture Organization of the United Nation*. Retrieved from: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0204e/i0204e00.pdf>>. Accessed in: 12 dec. 2015.

FDA (Food and Drug Administration). (2004). Initial decision. Withdrawal of approval of the new animal drug application for enrofloxacin for poultry [cited 2006 Mar 8]. Docket no. 00N-1571, 13–5. Retrieved from: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/mar04/031604/00n-1571-idf0001-vol389.pdf>>. Accessed in: 18 dec. 2015.

FDA (Food and Drug Administration). (2005). Enrofloxacin for poultry; final decision on withdrawal of new animal drug application following formal evidentiary public hearing.

Federal Register, *The Daily Journal of the United States Government*, 70, 146, 44105.

Retrieved from: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/05-15224.htm>>. Accessed in: 18 dec. 2015.

Hickerson, A. D., & Carson, C. C. (2006). The treatment of urinary tract infection and use of ciprofloxacin extended release. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 15, 519–532.

Retrieved from: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1517/13543784.15.5.519#.VrZcnfkrLIU>>. Accessed in: 18 dec. 2015. DOI: 10.1517/13543784.15.5.519.

Ito, N. M. K., Miyaji, C. I., Lima, E. A., & Okabayashi, S. (2005). Antimicrobianos: usos preventivos e curativos na avicultura. In J. Palermo Neto, H. Spinosa, & S. L. Górnaiak (Eds.), *Farmacologia Aplicada à Avicultura* (pp. 115-147). (1th ed.). São Paulo: Roca, (Chapter 8).

Kelly, L., Smith, D. L., Snary, E. L., Johnson, J. A., Harris, A. D., Wooldridge, M., & Morris, J. G. Jr. (2004). Animal growth promoters: to ban or not to ban? A risk assessment approach.

International Journal of Antimicrobial Agents, 24(3), 205-12. Retrieved from: <[http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(04\)00186-4/pdf](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(04)00186-4/pdf)>. Accessed in: 20 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2004.04.007.

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment – Review article. *Ecological Indicators*, 8, 1–13. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X07000647>>. Accessed in: 12 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.

Martinez, M., McDermontt, P., & Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 172, 10–28. Retrieved from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023305001814>>. Accessed in: 12 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.07.010.

Ministry of Health, Labour and Welfare. Department of Food Safety, Japan. (2006). *Partial Revision of Specifications and Standards for Food, Food Additives, Etc.* Shoku-An No. 1130001, november 30, 2006. Retrieved from: <<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/05-14.pdf>>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Ovando, H. G., Gorla, N., Luders, C., Poloni, G., Errecalde, C., Prieto, G., & Puelles, I. (1999). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22(3), 209–212. Retrieved from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2885.1999.00211.x/pdf>>. Accessed in: 15 dec. 2015. DOI: 10.1046/j.1365-2885.1999.00211.x.

San Martín, B., Cornejo, J., Iragüen, D., Hidalgo, H., Anadón, A. (2007). Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1952–1957. Retrieved from: <<https://www.researchgate.net/publication/6037645>>. Accessed in: 15 dec. 2015.

Sharma, P. C., Jain, A., & Jain, S. (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 66(6), 587-604. Retrieved from: <http://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2009/6/587.pdf>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Shim, J. H., Shen, J. Y., Kim, M. R., Lee, C. J., & Kim, I. S. (2003). Determination of the fluoroquinolone enrofloxacin in edible chicken muscle by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7528-3752. Retrieved from: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf0346511>>. Accessed in: 18 dec. 2015. DOI: 10.1021/jf0346511.

Stolker, A. A. M., Zuidema, T., & Nielen, M. W. F. (2007). Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(10), 967-979. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/223389308_Residue_analysis_of_veterinary_drugs_and_growth-promoting_agents>. Accessed in: 21 dec. 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2007.09.008.

The Japan Food Chemical Research Foundation (2016a). *Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods*. Retrieved from: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=12800>. Accessed in: 17 dec. 2015.

The Japan Food Chemical Research Foundation (2016b). *Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods*. Retrieved from: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=50000>. Accessed in: 17 dec. 2015.

The Japan Food Chemical Research Foundation (2016b). *Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods*. Retrieved from: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=50000>. Accessed in: 17 dec. 2015.

Table 1.

Mass spectrometry conditions and retention times for selected compounds.

Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>) [M+H]⁺	Product ions (<i>m/z</i>)^a	Declustering potential (V)	Collision energy (V)^a	Cell exit potential (V)^a	Retention time (min)
CIP	332.0	231.1/314.1	61	53/33	18/16	5.13
ENR	360.2	316.1/245.1	81	29/39	16/14	5.17
NOR	320.0	302.2/276.0	61	33/27	16/14	5.01
ENR_d5	365.1	321.3/245.1	76	31/52	16/8	5.14

^aNumerical values are given in the order quantifier/qualifier ion.

Table 2.

Muscle concentration of ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (plus its metabolite ciprofloxacin) (ENR + CIP) and norfloxacin (NOR) for broiler chickens treated orally with each these drugs at the rate of 10, 10 and 15 mg kg⁻¹ body weight, respectively, for 3 consecutive days^a.

Time after the last dose (h)	Residues (µg kg ⁻¹)		
	CIP	ENR + CIP	NOR
6	2,005.5 ± 597.6	11,067.5 ± 547.4	1,526.5 ± 84.0
12	472.8 ± 157.7	4,834.5 ± 287.1	386.8 ± 98.6
24	25.8 ± 3.4	1,179.5 ± 28.7	19.4 ± 7.1
48	9.9 ± 3.4	197.5 ± 61.8	<LOQ ^b
72	<LOQ ^b	43.0 ± 9.9	<LOD ^c
96	<LOD ^c	23.0 ± 7.5	<LOD ^c
120	<LOD ^c	9.0 ± 3.2	<LOD ^c
144	<LOD ^c	5.0 ± 1.0	<LOD ^c
168	<LOD ^c	4.0 ± 1.5	<LOD ^c
192	<LOD ^c	2.7 ± 1.6	<LOD ^c
216	<LOD ^c	2.4 ± 0.4	<LOD ^c
240	<LOD ^c	<LOD ^c	<LOD ^c

^a Each value is the mean ± SD for 4 broiler chickens.

^b LOQ (limit of detection) equivalent to 20 µg kg⁻¹.

^c LOD (limit of detection) equivalent to 10 µg kg⁻¹.

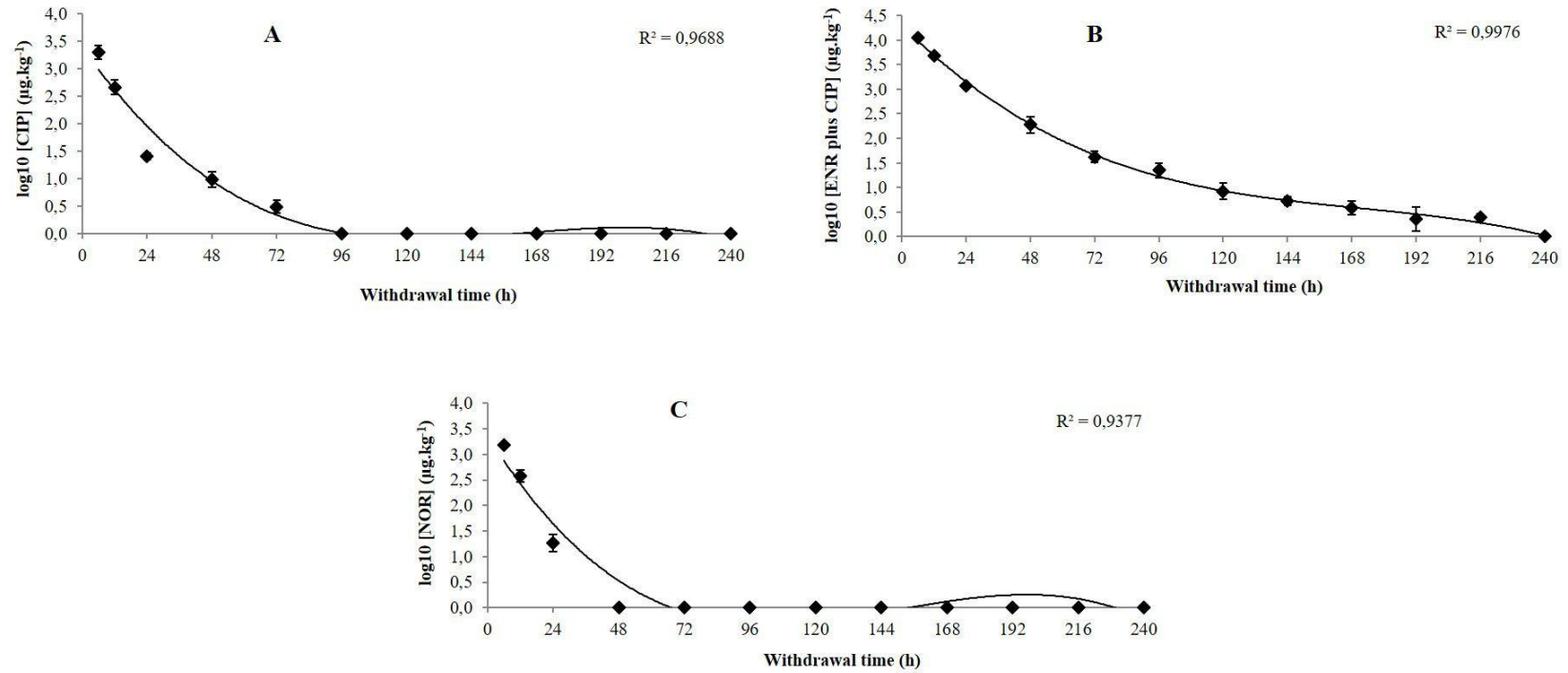


Fig. 1. Mean of concentrations of ciprofloxacin (A), enrofloxacin plus ciprofloxacin (B) and norfloxacin (C) in chicken muscle samples. Data represent mean \pm SD values for 4 broiler chickens.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar resíduos de antibióticos em baixas concentrações é de suma importância, visto que a análise destes compostos em matrizes alimentares vem tornando-se uma prática indispensável, tanto para fins econômicos quanto para a saúde do consumidor (FARRÉ; BARCELÓ, 2013). Porém, deve-se considerar também, os custos envolvidos nas análises, bem como a aplicabilidade do método, a fim de que possa ser implantado na rotina laboratorial (CIFUENTES, 2012).

Os antibióticos escolhidos para a realização deste estudo são amplamente utilizados na prática veterinária (MICHALOVA, 2004; PAMVet/PR, 2005). A opção por desenvolver os experimentos com frangos de corte é devido a sua importância econômica e alimentar para o Brasil (AVISITE, 2013).

A proposta de desenvolvimento de um método de extração rápido, eficiente para FQs e TCs e sem a utilização de cartuchos de SPE para a etapa de purificação do extrato foi alcançada. As metodologias de extração e de análise cromatográfica foram eficientes para as duas classes de fármacos estudados. A necessidade de utilização de EDTA durante a extração da matriz, a fim de evitar a ação quelante das TCs com íons metálicos da amostra, não influenciou negativamente a recuperação das FQs.

As FQs apresentam características anfotéricas, devido à presença de ácido carboxílico e grupos funcionais amina em sua estrutura química. Dessa forma, houve a necessidade de acidificação da solução de extração (acetonitrila) com ácido fórmico (GAUGAIN-JUHEL et al., 2009; GENTILI et al., 2005; GOSETTI et al., 2010; SÁRKÖZY, 2001). Com isso, houve uma maior solubilização destes fármacos sem prejuízo ao processo de extração e recuperação das TCs.

A utilização de metanol como fase móvel orgânica proporcionou uma maior sensibilidade ao método, bem como picos com melhor resolução. A adição de 0,1% (v/v) de ácido fórmico nas fases orgânica e aquosa auxiliou no aumento da resposta do sinal e da sensibilidade. O uso de ácido fórmico na fase móvel tem sido relatado na literatura e é muito para separação cromatográfica e determinação de medicamentos veterinários em métodos multirresíduos (DE ALMEIDA, et al., 2015; GORISSEN, 2015; HOU et al., 2015; JANK et al., 2015; LOPES et al., 2012; MARTINS et al., 2014, 2015).

O gradiente foi otimizado de modo a proporcionar uma separação adequada dos 7 compostos analisados em menos de 7 minutos, totalizando 10 minutos de eluição, considerando o tempo para reequilíbrio da coluna. Outros parâmetros, como temperatura da

coluna, vazão e volume de injeção, foram otimizados, a fim de obter-se uma separação rápida e confiável.

As primeiras injeções no LC foram realizadas com o solvente de extração (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%, v/v) e a solução de diluição (metanol:água, 30:70, v/v), a fim de realizar o controle de qualidade de ambos. Para avaliar e evitar o efeito de *carry-over* durante a análise cromatográfica, ficou definida a injeção da solução de extração a cada três amostras.

O estudo do efeito matriz foi realizado comparando-se as curvas analíticas de padrões diretos, ou seja, soluções preparadas em solvente e em matriz. Neste sentido, as médias das respostas dos analitos das duas curvas analíticas (na mesma faixa de concentração), obtidas em um mesmo experimento, foram comparadas utilizando os testes estatísticos F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student) de comparação de médias. Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração da curva analítica (MAPA, 2011).

Em nosso estudo, não foi observado efeito matriz, indicando que o processo de extração e purificação das amostras foi eficiente para todos os compostos avaliados em músculo de frango. Porém, o efeito matriz sofre variações ao longo do tempo e depende também da condição do instrumento utilizado. Por isso, deve ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina (PRESTES, 2007). Em nossos estudos de aplicabilidade do método e depleção, optamos por analisar as amostras utilizando curvas analíticas em matriz, a fim de assegurar que não houve qualquer interferência da matriz ao longo do processo.

Dessa forma, o controle de qualidade analítica consistiu na utilização de uma curva analítica em matriz com seis níveis - incluindo o zero - amostra branca, três amostras brancas fortificadas no valor do LMR e extraídas junto com as demais, além de três amostras brancas fortificadas no valor do LMR após o processo de extração (*tissue standard*).

A aplicabilidade e a robustez do método proposto puderam ser verificadas por meio da análise de amostras reais coletadas em um abatedouro local. Dessa forma, possibilitou-se a avaliação do método perante amostras de diferentes lotes de frangos, levando-se em consideração as variações que podem existir quanto à composição das matrizes. Das 65 amostras de músculo (peito) de frango analisadas pela metodologia proposta, 3 apresentaram níveis quantificáveis para ENR, porém, todas abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira. Para os ensaios de validação e aplicabilidade do método, todas as amostras

analisadas estavam em condições adequadas de armazenamento, ou seja, a uma temperatura de -20 °C.

Para os estudos de depleção, foram administrados, via oral, CIP, ENR e NOR, por 3 dias consecutivos, e CTC, DOX e OTC, durante 5 dias, nas doses de tratamento (Anadón et al., 1994; 2012; Ito et al., 2005). Os resultados mostraram que a concentração de todos os fármacos no músculo foi alta 6 h após a última dose administrada e diminuiu com o passar do tempo. Três dos antibióticos estudados permaneceram no tecido durante mais tempo, sendo detectados resíduos de ENR e DOX até 216 h após a última dose, e OTC, até 240 h.

Os períodos de carência informados pelos fabricantes dos medicamentos utilizados nos experimentos foram de 5 dias para CIP, OTC e CTC, 6 dias para DOX e 7 dias para ENR e NOR. Foi verificado que não permaneceram resíduos de nenhum dos fármacos avaliados acima do LMR estabelecido pelo Brasil, Comunidade Europeia e Japão, respeitando-se os períodos de carência. Porém, se considerarmos os LMRs estabelecidos pelos Estados Unidos e Canadá para ENR e seu metabólito CIP, ou seja, zero de tolerância, seria necessário aguardar 10 dias após a última dose administrada para não haver mais resíduos na carne. Já para os demais antibióticos, os resíduos ficaram abaixo do LMR estabelecido para músculo de frango em todos os países citados.

7 CONCLUSÕES

O procedimento de extração e purificação da matriz músculo apresentou efeito satisfatório e alta eficiência para a remoção de coextrativos. Além disso, trata-se de um procedimento simples, considerando a complexidade da matriz. O método proposto para análise de FQs e TCs preenche todos os requisitos para detecção e quantificação dos setes analitos estudados. Além disso, esta metodologia analítica pode ser validada para aplicação em outras matrizes e espécies animais.

A aplicabilidade do método pôde ser avaliada através da análise de 65 amostras de músculo de frango, das quais, 3 apresentaram resíduos de ENR, porém, abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira. Apesar disso, é importante o monitoramento da utilização deste antibiótico, a fim de evitar resíduos na carne acima do LMR.

A partir dos resultados dos estudos de depleção, ressalta-se que não há necessidade de abolir o uso de antibióticos em frangos de corte, pois a saúde dos animais depende de sua correta administração. O que deve ocorrer é um monitoramento para que as substâncias aplicadas sejam aprovadas para tal uso, bem como utilizadas em concentrações seguras pré-estabelecidas. Além disso, devem ser respeitados os períodos de carência prescritos e os LMRs estabelecidos por diferentes países, de forma a evitar a presença de resíduos de medicamentos e garantir a segurança dos alimentos e a saúde pública.

Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de manutenção e aprimoramento de um rigoroso e eficiente monitoramento destas substâncias, com metodologias e equipamentos modernos e sensíveis, bem como uma equipe treinada, evitando a geração de resíduos e contaminantes que possam impactar sobre a saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal (2015). **Relatório Anual 201**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2016.
- AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 1289-1300, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500121/pdf/cvj_12_1289.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2016.
- ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009, 136 p.
- ANDERSON, C. R.; RUPP, H. S.; WU, W. H. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 23-32, 2005. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0021967305007648/1-s2.0-S0021967305007648-main.pdf?_tid=8a5f5e72-c912-11e5-ab18-00000aacb35d&acdnat=1454351897_845bf5a53de3c01321d34d96361e04b9>. Acesso em: 03 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.04.013.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares – JECFA, 2015. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/iqM>>. Acesso em: 10 dez. 2015.
- AVISITE. 2013. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/noticias/index.php?codnoticia=14231>>. Acesso em: 11 jan. 2016.
- BACCARO, M. R et al. Resistência antimicrobiana de amostras de Escherichia coli isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 15-18, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/227860667_Resistencia_antimicrobiana_de_amostras_de_Escherichia_coli_isoladas_de_fezes_de_leitoes_com_diarréia>. Acesso em: 11 dez. 2015.
- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 17-24, 2000. Disponível em: <http://jac.oxfordjournals.org/content/46/suppl_3/17.full.pdf+html>. Acesso em: 18 dez. 2015.
- BERENDSEN, B. J. A.; STOLKER, L. A. M.; NIELEN, M. W. F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 229-239, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S016599361200307X/1-s2.0-S016599361200307X-main.pdf?_tid=238ee5c2-c913-11e5-a543-00000aacb361&acdnat=1454352154_738ccb4b77bbcd920378e8930437f1c8>. Acesso em: 18 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2012.09.019.
- BISHOP, Y. **The Veterinary Formulary**, 5th ed. London: Pharmaceutical Press, 2001, 692 p.

BITTENCOURT, M. S. et al. High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, p. 508-516, 2012. Disponível em: <<http://content-ebSCOhost-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/ContentServer.asp?T=P&P=AN&K=21988236&S=R&D=mdc&EbscoContent=dGJyMMv17ESepq84xNvgOLCmr06ep7FSsqu4Sq6WxWXS&ContentCustomer=dGJyMPGrtlGuq7FJuePfgex44Dt6fIA>>. Acesso em: 18 nov. 2015. DOI:10.1080/19440049.2011.606228.

BLATT, J. M.; MIRANDA, M. C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 7, p. 10-14, 2005.

BOSCHER, A. et al. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6394-6404, 2010.

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 947-966, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-009-2930-6>>. Acesso em: 08 dez. 2015. DOI: 10.1007/s00216-009-2930-6.

BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J. **Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis**. New York: Marcel Dekker, 1154p., 2001.

BOUSOVA, K.; SENYUVA, H.; MITTENDORF, K. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1274, p. 19-27, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312018201>>. Acesso em: 09 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.11.067.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5, de 24 de janeiro de 2000. Cria Grupo de Trabalho sobre Medicamentos Veterinários em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 jan. 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de origem Animal – PAMVet. **Diário Oficial da União**, 18 set. 2003b. Seção 1, p. 90-91.

BRASIL. Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005. Aprova a Estrutura Regimental e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 jan. 2005. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 dez. 1950. Seção 1, p. 18161.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 42 de 21 de dezembro de 1999. Altera o PNCR e leva a público a programação anual: Programas de Controle de Resíduos em Carnes - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999. Seção 1, p. 253.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 41 de 30 de agosto de 2011. Art. 1º Alterar os arts. 14 e 15 do Anexo I da Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 ago. 2011. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 26 de 9 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jul. 2009. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 3, de 22 de janeiro de 1999. Reedita o PNCRB. Altera o PCRBC. Aprova os Programas de Controle de Resíduos Biológicos em Mel, Leite e Pescado e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 fev. 1999b. Seção 1, p. 15.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 42**, de 20 de dezembro de 1999. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2042-1999.pdf>. Acesso em: 11 de dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Dispõe sobre a Alteração do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 dez. 1999a. Seção 1, p. 213.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 51, de 06 de fevereiro de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal - PNCRB. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 fev. 1986. Seção 1, p. 2228.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995. Dispõe sobre Atribuição ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB, as incumbências que cita. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 ago. 1995. Seção 2, p. 6048.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 11, de 07 de maio de 2014. **Diário Oficial da União**, 07 maio 2014. Seção 1, p. 5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resíduos e Contaminantes – Animal**. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Portaria nº 86, de 26 de janeiro de 1979. Aprova o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Carnes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 fev. 1979. Seção 1, p. 1913.

CAMPOS, A. C. F. B. et al. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 575-580, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n5/04.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000500004.

CHIAOCHAN, C. et al. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, p. 117-129, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267010012304>>. Acesso em: 09 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2010.09.048.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n3/a30v31n3.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2016. DOI: 10.1590/S0100-40422008000300030.

CIFUENTES, A. Food Analysis: Present, Future, and Foodomics. **International Scholarly Research Notices: Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-16, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/801607/>>. Acesso em: 13 dez. 2015. DOI:10.5402/2012/801607.

DE ALMEIDA, M. P. et al. Optimization and validation method to evaluate the residues of β -lactams and tetracyclines in kidney tissue by UPLC-MS/MS. **Talanta**, v. 144, p. 922-932, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914015301727>>. Acesso em: 03 dez. 2015. DOI:10.1016/j.talanta.2015.07.048.

DE JONG, A. et al. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 733-744, 2009. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/63/4/733.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 dez. 2015. DOI:10.1093/jac/dkp012.

DI CORCIA, A.; NAZZARI, M. Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 53-89, 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0021967302009056/1-s2.0-S0021967302009056-main.pdf?_tid=dd48bb0e-c914-11e5-9a41-00000aacb362&acdnat=1454352895_65d5a444a7d4bb453250625892778b09>. Acesso em: 12 dez. 2015. DOI: 10.1016/s0021-9673(02)00905-6.

EMA. European Medicines Agency. EMA/CVMP/VICH/463202/2009. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). **Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies**. London, 12 february 2015. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105053.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2015.

EMA. European Medicines Agency. **Maximum residue limit assessment reports**, 2010. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&mid=WC0b01ac058008d7ad>. Acesso em: 04 jan. 2016.

EMA. European Medicines Evaluation Agency. EMA/CVMP/VICH/463199/2009-CONSULTATION. Veterinary Medicines and Inspections. **Guideline on studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods**. London, 14 december 2009. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500040498.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2015.

ENGLERT, S. I. **Avicultura: tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade**. 5. ed. Porto Alegre: Agropecuária, 1978, p. 35-36.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelas, 12 August 2002, L221: 8-36, 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2010/37/EC. Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Communities**, 22 December 2009, L15:01-72, 2010. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Council Directive of 23 November 1970, (70/524/EEC), concerning additives in feeding-stuffs. **Official journal of the European Communities**, L270/1, 840-856, 1970. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31970L0524&from=en>>. Acesso em: 08 dez. 2015.

FAO/WHO/OIE. **Report of the Joint FAO/WHO/OIE Expert meeting on critically important antimicrobials**. Report of the FAO/WHO/OIE Expert Meeting FAO Headquarters, Rome 26-30 November 2007. Rome, Italy, 2008. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0204e/i0204e00.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis of emerging contaminants in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 240-253, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993612003676>>. Acesso em: 03 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2012.12.003.

FDA. Food and Drug Administration. **Enrofloxacin for poultry; final decision on withdrawal of new animal drug application following formal evidentiary public hearing.** 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/05-15224.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 38-43, 2013. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/27334/1/Development%20and%20validation%20of%20a%20multi-residue%20and%20multiclass%20ultra-high-pressure%20liquid.pdf>>. Acesso em 18 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.05.019.

GAUGAIN-JUHEL, M. et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach, **Food Additives & Contaminants**, v. 26, p. 1459-1471, 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030903150575>>. Acesso em 22 dez. 2015. DOI: 10.1080/02652030903150575.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 705-733, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993605000889>>. Acesso em 18 dez. 2015. DOI:10.1016/j.trac.2005.02.007.

GORISSEN, B. et al. Determination of selected veterinary antimicrobials in poultry excreta by UHPLC-MS/MS, for application in Salmonella control programs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4447-4457, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-014-8449-5>>. Acesso em: 13 dez. 2015. DOI:10.1007/s00216-014-8449-5.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309017397>>. Acesso em: 05 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.060.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 31, n. 1292, p. 173-188, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731300037X>>. Acesso em 05 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.072.

HALLING-SORENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere**, v. 36, p. 357-393, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569937>>. Acesso em 05 dez. 2015.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464 p.

HOFF, R. B. et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014007267>>. Acesso em: 03 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.08.046.

HOFF, R. B. et al. Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC–QqLIT-MS/MS). **Talanta**, v. 134, p. 768-778, 2015b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003991401400873X>>. Acesso em: 03 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.10.045.

HOU, J. et al. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 4545-4554, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-014-3632-y>>. Acesso em: 07 dez. 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3632-y.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, revisão 04, julho de 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2015.

ITO, N. M. K. et al. Antimicrobianos: Usos Preventivos e Curativos na Avicultura. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos**, 1. ed. São Paulo: Roca, 2005, cap. 8. p. 115-148.

JANK, L. et al. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). **Talanta**, v. 1, n. 144, p. 686-695, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914015301090>>. Acesso em 19 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.06.078.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment – Review. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X07000647>>. Acesso em: 12 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas Alimentícias** - Composição e Controle de Qualidade. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 187-226.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4. ed. São Paulo: Editora Átomo, 2008, 278 p.

LINZMEIER, L. et al. Uso de Antibióticos em aves de produção. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, ano VII, n. 12, 2009. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/976s3vLOvIY3TKW_2013-6-24-16-28-21.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2015.

LÖHREN, U.; RICCI, A.; CUMMINGS, T. S. Orientações para o Uso de Antimicrobianos em Aves Domésticas. In: GUARDABASSI, L., JENSEN, L. B., KRUSE, H. (Eds.). **Guia de antimicrobianos em Veterinária**, 1. ed., Porto Alegre: ArtMed, 2010, c. 8, p. 160-179.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of a methodology to qualitatively screening veterinary drugs in porcine muscle via an innovative extraction/clean-up procedure and LC-MS/MS analysis. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 12, p. 1667-1676, 2011a. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2011.609136?journalCode=tfac20>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.1080/19440049.2011.609136.

LOPES, R. P. et al. Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 3, p. 606-613, 2011b. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2011/AY/C0AY00587H>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.1039/C0AY00587H.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 89, p. 201-208, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011010794>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI:10.1016/j.talanta.2011.11.082.

LOPES, R. P. et al. Development and validation of an efficient and innovative method for the quantification of multiclass veterinary drugs in milk by using LC-MS/MS analysis. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5121-5127, 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2013/ay/c3ay40567b>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.1039/c3ay40567b.

MAGALHÃES, C. G. et al. In-house validation of PremiTest, a microbiological screening test with solvent extraction, for the detection of antimicrobial residues in poultry muscles. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 4, p. 535-540, 2012.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4018-4040, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731000379>>. Acesso em: 19 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.03.015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Resíduos e Contaminantes em Alimentos. 1 ed. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 227 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos veterinários. Orientações para o uso responsável**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Cartilha_Produtos.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

MARTINS, M. T. et al. A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 374-383, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014003270>>. Acesso em: 22 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.04.049.

MARTINS, M. T. et al. Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 3, p. 333-341, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/19440049.2015.1007091>>. Acesso em: 25 nov. 2015. DOI: 10.1080/19440049.2015.1007091.

MEDEIROS, P. T. et al. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. **Biotemas**, v. 22, p. 157-163, 2009. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/viewFile/2175-7925.2009v22n3p157/17927>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

MENDES, A. A. Panorama da Avicultura Nacional e Perspectivas do Setor. ABPA. **Sanidade Avícola – Fortaleza Nacional**. Brasília, 21 de outubro de 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Reuni%C3%A3o%20PNSA_%20Sanidade%20Av%C3%ADcola-Fortaleza%20Nacional_/2%20Dr_%20Ariel%20-%20Panorama%20da%20avicultura%20nacional%20e%20perspectivas%20para%20o%20setor.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2016.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinární Medicína**, v. 49, p. 79-100, 2004. Disponível em: <<http://vri.cz/docs/vetmed/49-3-79.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE. Department of Food Safety, Japan. *Partial Revision of Specifications and Standards for Food, Food Additives, Etc.* Shoku-An No. 1130001, november 30, 2006. Disponível em: <<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/05-14.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2015.

MOL, H. G. J. et al. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450-9459, 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac801557f>>. Acesso em: 02 dez. 2015. DOI: 10.1021/ac801557f.

PAMVet/PR. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, 2005. Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte, 23p. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>>. Acesso em: 11 de dez. 2015.

PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Fármacos antimicrobianos fluorquinolônicos. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**, 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, cap. 45, p. 750-766.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n5/a48v31n5.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2015. DOI: 10.1590/s0100-40422008000500048.

PIDDOCK, L. J. V. et al. Fluoroquinolone resistance in Campylobacter species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 19-26, 2003. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/51/1/19.full.pdf+html>>. Acesso em: 25 nov. 2015. DOI: 10.1093/jac/dkg033.

POSYNIK, A.; ŻMUDZKI, J.; SEMENIUK, S.; NIEDZIELSKA, J.; ELLIS, R. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 13, n. 4, p. 279-85, 1999. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-0801\(199906\)13:4%3C279::AID-BMC844%3E3.0.CO;2-A/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-0801(199906)13:4%3C279::AID-BMC844%3E3.0.CO;2-A/epdf)>. Acesso em: 02 dez. 2015.

PRADO, C. K.; MACHINSKI JUNIOR, M. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 448-456, 2011. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5523/4792>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/46.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

PRESTES, O. D. et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v36n5/15.pdf>>. Acesso em 21 nov. 2015. DOI: 10.1590/S0100-40422013000500015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol27No5_771_16-RV03165.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2015. DOI: 10.1590/S0100-40422004000500017.

RONALD, A. R.; DONALD, L. (Eds.). **Fluoroquinolone Antibiotics**. 1st. ed. Basel: Birkhäuser, 2003, 261 p.

ROSÁRIO, T. R. Resíduos de Medicamentos em Carne de Frango e Ovos. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos**, 1. ed., São Paulo: Roca, 2005, cap. 8, p. 287-302.

ROSE, M. D.; BYGRAVE, J.; STUBBINGS, G. W. Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food. **Analyst**, v. 123, n. 12, p. 2789-2796, 1998. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/12865122_Extension_of_multi-residue_methodology_to_include_the_determination_of_quinolones_in_food>. Acesso em: 16 dez. 2015. DOI: 10.1039/a805038d.

ROSTAGNO, M. **Uso de antibióticos na avicultura**. Avicultura Industrial, 2010. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/antimicrobianos-em-aves/20100329111520_J_005>. Acesso em: 20 dez. 2015.

RÜBENSAM, G. et al. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, p. 55-60, 2013. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.075.

RUBIES, A. et al. Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 72, p. 269-276, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014003270>>. Acesso em: 01 nov.2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.10.030.

SANTANA, E. S. et al. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Centro Científico Conhecer**, 2011. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20agrarias/uso%20de%20produtos.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

SÁRKÖZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Veterinárni Medicína – Czech**, v. 46, p. 257-274, 2001. Disponível em: <<http://agriculturejournals.cz/publicFiles/141430.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2016.

SPELTINI, A. et al. Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: sample preparation and determination. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 8, p. 1115-1131, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200900753/pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2015. DOI: 10.1002/jssc.200900753.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Eds.). **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 918 p.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305002797>>. Acesso em 29 nov. 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.02.037.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 68-78, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267009001007>>. Acesso em: 09 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2009.01.029.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328–334, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009912004003364>>. Acesso em: 09 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.

THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods**, 2016a. Disponível em: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=12800>. Acesso em: 11 dez. 2015.

THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. **Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods**, 2016b. Disponível em: <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/agrdtl.php?a_inq=50000>. Acesso em: 11 dez. 2015.

WOODWARD, K. N. The Toxicity of Particular Veterinary Drug Residues. In: WATSON, D. H. (Ed.). **Pesticide, veterinary and other residues in food**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 175-223.

ZANATTA, G. F. et al. Suscetibilidade de amostras de Escherichia coli de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivo Instituto Biológico**, v.71, n. 3, p. 283-286, 2004. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V71_3/zanatta.PDF>. Acesso em: 11 dez. 2015.

ANEXO

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para estudos de depleção de antibióticos em frangos de corte."

Número do Parecer: 061/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 21/08/2014.

Santa Maria, 22 de Agosto de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM