BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

Avaliação dos teores de oxitetraciclina por cromatografia à líquido de
alta eficiência em gado leiteiro com doença do casco

Cláudia Esteban

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora
Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo
2008

19134

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013529

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

E79a	<p>Esteban, Cláudia</p> <p>Avaliação dos teores de oxitetraciclina por cromatografia à líquido de alta eficiência em gado leiteiro com doenças do casco / Cláudia Esteban. -- São Paulo, 2008. 112p.</p> <p>Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza</p> <p>I. Contaminação de alimentos : Toxicologia 2. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise : Toxicologia I. T. II. Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.</p> <p>615.954 CDD</p>
------	--

Cláudia Esteban

Avaliação dos teores de oxitetraciclina por cromatografia à líquido
de alta eficiência em gado leiteiro com doença do casco

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Cláudia Esteban
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 01 de fevereiro de 2008.

Agradeço a meus pais, meus pés, pela sustentação.
A minhas irmãs, irmão e cunhados por serem as mãos nas horas difíceis.
A minha orientadora e inspiradora no pensar.
Aos meus sobrinhos, pelo sorriso
indispensável.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em toxicologia e análises toxicológicas pela oportunidade oferecida.

Ao Prof. Dr. Celso Antonio Rodrigues pelo fornecimento das amostras.

Ao Professor Associado Hélio Alexandre Stefani por disponibilizar os recursos em seu laboratório.

Ao Dr. Walter dos Reis Pedreira Filho, da Fundacentro pela pronta ajuda.

A Leila R. de Carvalho Aranha pela correção das referências bibliográficas.

A todos os meus colegas e amigos que de forma direta e indireta auxiliaram em diversos momentos no desenvolvimento deste trabalho.

Aos que já foram e deixaram o seu aprendizado.

A Deus pela infinita sabedoria.

Resumo

ESTEBAN, C. Avaliação dos teores de oxitetraciclina por cromatografia à líquido de alta eficiência em gado leiteiro com doença do casco. São Paulo, 2008. Tese (doutorado). 115 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. cesteban@usp.br. Orientador: Elizabeth de Souza Nascimento

Palavras-chave: oxitetraciclina, administração intramuscular, administração tópica, resíduos em leite, plasma e líquido sinovial.

O presente trabalho visa desenvolver métodos analíticos que permitam determinar as concentrações de oxitetraciclina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, no leite, plasma e líquido sinovial, além de analisar as concentrações correspondentes em gado leiteiro em lactação portadoras de doença do casco submetidos aos tratamentos intramuscular e tópico. Adicionalmente, são tecidos comentários sobre a eficácia clínica destes tratamentos.

Desta forma, objetivando determinar a depuração de oxitetraciclina no organismo dos animais tratados, a concentração no sítio de ação e a quantidade residual em leite, as amostras biológicas foram colhidas e quantificadas em diferentes tempos pré e pós-administração do fármaco.

Os métodos analíticos validados apresentaram linearidade, limite de detecção, quantificação, exatidão, precisão e recuperação adequadas à quantificação do antibiótico nas matrizes estudadas.

Através da administração do medicamento por via intramuscular, observou-se resíduos acima dos limites máximos (100ppb) estabelecidos pela legislação brasileira para oxitetraciclina no leite até 120 horas após a

última administração do medicamento pelo esquema seriado de doses. Já pela via tópica, não foram observados valores residuais na matriz biológica. Do ponto de vista clínico, o tratamento tópico foi eficiente nos animais tratados, levando a cura das lesões. Com relação ao tratamento intramuscular, não foram observados resultados satisfatórios, pois a maioria das lesões não regrediu após as administrações.

Abstract

ESTEBAN, C. Oxytetracycline residue evaluation by High Pressure Liquid Chromatography in milk cows with foot lameness. São Paulo, 2008. Tese (doutorado). 115 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. cesteban@usp.br. Thesis advisor: Elizabeth de Souza Nascimento

Key-words: oxytetracycline, intramuscular administration, topic administration, residues in milk, serum and synovial fluid.

The purpose of the present work is to develop methods which allow the determination of oxytetracycline by High Pressure Liquid Chromatography in milk, serum and synovial fluid, as well as analyze the corresponding concentration in milk cattle with foot lameness subjected to intramuscular and topical administration of the antibiotic. It is also commented the clinical efficacy of these two treatments.

Thus, to determine the clearance of oxytetracycline in the body of the treated animals, the concentration on the site of action, and the antibiotic residue in milk, biological samples have been collected and analyzed for the oxytetracycline content at different times before and after the drug administrations.

The validated analytical methods showed suitable linearity, detection and quantification limits, accuracy, precision and recovery, allowing proper quantification of the antibiotic in the studied biological matrices.

When administered intramuscularly, oxytetracycline residues were observed in milk above the maximum limits (100ppb) established by the brazilian legislation up to 120 hour after the last administration of the

medicine using multiple doses treatment, whereas on topical use, residues were not observed in this matrix.

When analyzing the clinical aspects, topical treatment was very efficient, leading to the healing of the treated animals. In relation to intramuscular treatment, non satisfactory results were observed, as most of lesion did not disappear after the antibiotic administration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Agente anti-microbiano	10
2.2. Tetraciclina e a oxitetraciclina	11
2.2.1. Farmacocinética	13
2.2.2. Farmacodinâmica.....	16
2.2.3. Efeitos adversos.....	18
2.2.4. Uso das tetraciclina em medicina veterinária e sua associação às infecções podais.....	19
2.2.5. Determinação da oxitetraciclina por cromatografia líquida e alta eficiência (CLAE)	25
3. OBJETIVO.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Animais e grupos.....	31
4.2. Procedimentos.....	34
4.3. Material.....	37
4.3.1. Reagentes.....	37
4.3.2. Equipamentos, acessórios e vidraria.....	37
4.4. Métodos.....	38
4.4.1. Método analítico para a determinação de oxitetraciclina em leite.....	38
4.4.1.1. Condições cromatográficas.....	38
4.4.1.2. Procedimento analítico – análise de oxitetraciclina em leite.....	39
4.4.2. Método analítico para a determinação de oxitetraciclina em plasma	40
4.4.2.1. Condições cromatográficas.....	40
4.4.2.2. Procedimento analítico.....	41
4.4.3. Método analítico para a determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial.....	42
4.4.3.1. Condições cromatográficas.....	42
4.4.3.2. Procedimento analítico.....	43
4.4.4. Parâmetros de validação.....	44
4.4.4.1. Linearidade.....	44
4.4.4.2. Curva de calibração.....	46
4.4.4.3. Limite de detecção.....	47

4.4.4.4.Limite de quantificação.....	47
4.4.4.5.Recuperação.....	47
4.4.4.6.Precisão.....	48
4.4.4.7.Exatidão.....	49
4.4.4.8.Estabilidade do analito na amostra.....	49
 5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DAS MATRIZES BIOLÓGICAS COLETADAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE OXITETRACICLINA POR VIA DÉRMICA E INTRAMUSCULAR.....	 50
 6. RESULTADOS.....	 51
6.1. Leite.....	51
6.1.1.Método Analítico.....	51
6.1.1.1.Linearidade.....	51
6.1.1.2. Limite de detecção	52
6.1.1.3.Limite de quantificação.....	52
6.1.1.4.Recuperação.....	52
6.1.1.5. Precisão.....	53
6.1.1.6.Exatidão.....	53
6.1.1.7.Estabilidade.....	54
6.1.2. Perfil Cromatográfico.....	55
6.1.3. Determinação de oxitetraciclina no leite de vacas em lactação submetidas aos tratamentos dérmico e intramuscular.....	55
6.1.4.Animais submetidos ao tratamento intramuscular.....	56
6.1.5.Animais submetidos ao tratamento tópico.....	63
6.2. Plasma.....	63
6.2.1.Método Analítico.....	63
6.2.1.1.Linearidade.....	63
6.2.1.2. Limite de detecção	64
6.2.1.3.Limite de quantificação.....	64
6.2.1.4.Recuperação.....	64
6.2.1.5. Precisão.....	65
6.2.1.6.Exatidão.....	65
6.2.1.7.Estabilidade.....	66
6.2.2. Perfil Cromatográfico da oxitetraciclina extraída de plasma .	67
6.2.3. Determinação de oxitetraciclina no plasma de vacas em lactação submetidas aos tratamentos dérmico e intramuscular.....	67
6.2.4.Animais submetidos ao tratamento intramuscular.....	67
6.2.5.Animais submetidos ao tratamento tópico.....	74

6.3. Líquido Sinovial.....	74
6.3.1.Método Analítico.....	74
6.3.1.1.Linearidade.....	74
6.3.1.2. Limite de detecção	75
6.3.1.3.Limite de quantificação.....	75
6.3.1.4.Recuperação.....	75
6.3.1.5. Precisão.....	76
6.3.1.6.Exatidão.....	76
6.3.1.7.Estabilidade.....	77
6.3.2. Perfil Cromatográfico da oxitetraciclina extraída de líquido sinovial.....	78
6.3.3. Determinação de oxitetraciclina no líquido sinovial de vacas em lactação submetidas aos tratamentos dérmico e intramuscular.....	78
6.3.4.Animais submetidos ao tratamento intramuscular.....	78
6.3.5.Animais submetidos ao tratamento tópico.....	85
7. DISCUSSÃO.....	86
8. CONCLUSÃO.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Intervalo dinâmico (ng/mL) das curvas de calibração de oxitetraciclina em diferentes matrizes biológicas, número de replicatas e procedimento analítico específico.....	45
TABELA 2. Concentração de oxitetraciclina (ng/mL) utilizadas no preparo das curvas de calibração para as diferentes matrizes biológicas e número de replicatas.....	46
TABELA 3. Recuperação da oxitetraciclina em amostras de <i>pool</i> de leite, nas concentrações de 50, 1.000 e 5.000 ng/mL.....	52
TABELA 4. Precisão intra e inter ensaio do método analítico na determinação de oxitetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio-padrão.....	53
TABELA 5. Inexatidão do método analítico para a determinação do oxitetraciclina em leite.....	54
TABELA 6. Análise da estabilidade da oxiteraciclina em plasma, nas concentrações de 50 e 5.000 ng/mL conservadas à -20 °C (freezer).....	54
TABELA 7. Concentração de oxitetraciclina em leite em diferentes tempos (0 – 408h) após tratamento intramuscular (Grupo 1).....	57
TABELA 8. Recuperação da oxitetraciclina em plasma.....	64
TABELA 9. Precisão intra e inter-dias para a determinação de oxitetraciclina em plasma.....	65
TABELA 10. Porcentagem de inexatidão para a determinação de oxitetraciclina em plasma.....	66

TABELA 11. Análise da estabilidade da oxitetraciclina em plasma, nas concentrações de 50 e 10.000 ng/mL conservadas à -20 °C (freezer).....	66
TABELA 12. Concentração de oxitetraciclina no plasma em diferentes tempos (0 - 408 h) após tratamento intramuscular.....	68
TABELA 13. Recuperação da tetraciclina em líquido sinovial.....	75
TABELA 14. Precisão intra e inter-ensaio para a determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial.....	76
TABELA 15. Porcentagem de inexatidão para a determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial.....	77
TABELA 16. Análise da estabilidade da oxitetraciclina em líquido sinovial, nas concentrações de 50 e 5.000 ng/mL conservadas à -20 °C (freezer).....	77
TABELA 17. Concentração de oxitetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0- 408 h) após tratamento intramuscular.....	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química da oxitetraciclina.....	12
FIGURA 2. Mecanismo de ação dos antibióticos na síntese protéica.....	17
FIGURA 3. Esquema do tratamento dos animais submetidos à administração de cloridrato de oxitetraciclina intramuscular e tópica.....	36
FIGURA 4. Marcha analítica utilizada na determinação da oxitetraciclina em leite.....	40
FIGURA 5. Marcha analítica da determinação de oxitetraciclina em plasma.....	42
FIGURA 6. Marcha analítica da determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial	44
FIGURA 7. Curva de linearidade da oxitetraciclina em leite e seu coeficiente de determinação	51
FIGURA 8. Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (1 µg/mL) em leite	55
FIGURA 9. Médias das concentrações do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular.....	58
FIGURA 10. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 373.....	59
FIGURA 11. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 423.....	59

FIGURA 12. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 465.....	60
FIGURA 13. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 427.....	60
FIGURA 14. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 310.....	61
FIGURA 15. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 435.....	61
FIGURA 16. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 432.....	62
FIGURA 17. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 461.....	62
FIGURA 18. . Representação gráfica da linearidade da oxitetraciclina (50-10.000 ng/mL) em plasma.....	63
FIGURA 19. Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (10.000 ng/mL) em plasma.....	67
FIGURA 20. Média das concentrações de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular.....	69

FIGURA 21. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 423.....	70
FIGURA 22. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 427.....	70
FIGURA 23. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 310.....	71
FIGURA 24. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 435.....	71
FIGURA 25. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 465.....	72
FIGURA 26. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 432.....	72
FIGURA 27. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 461.....	73
FIGURA 28. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 373.....	73
FIGURA 29. Representação gráfica da linearidade da oxitetraciclina (50-5.000ng/mL) em líquido sinovial.....	74
FIGURA 30. Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (1.000 ng/mL) em líquido sinovial.....	78

FIGURA 31. Média das concentrações de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular.....	80
FIGURA 32. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 432.....	81
FIGURA 33. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 423.....	81
FIGURA 34. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 465.....	82
FIGURA 35. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 435.....	82
FIGURA 36. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 427.....	83
FIGURA 37. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 461.....	83
FIGURA 38. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 310.....	84
FIGURA 39. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 373.....	84

1. INTRODUÇÃO

As afecções que induzem à claudicação constituem-se em um dos mais importantes problemas que acometem a espécie bovina, sendo superadas somente por problemas reprodutivos e infecções na glândula mamária, implicando assim em prejuízos econômicos significativos ao agronegócio, além do sofrimento dos animais (BAGGOTT & RUSSELL, 1980; DESROCHERS et al., 1995; GREENOUGH et al., 1997; NUSS & WEAVER, 1991; STANEK, 1994; NAVARRE et al., 1999; WHITAKER et al., 1983).

A maioria das claudicações apresentadas por bovinos é originada de doenças podais nas quais pode haver a participação de microorganismos, dentre eles as bactérias: *Actinomyces pyogenes*, Gram negativa (G-) anaeróbica facultativa, como a mais freqüentemente encontrada, além dos *Streptococcus* spp. Gram Positivo (G+), *Salmonella* spp. (G-), *Escherichia coli* (G-), *Proteus* sp (G-) e *Fusobacterium necrophorum* (G- anaeróbico). As infecções podem também ser causadas por *Staphylococcus* spp. (G+), *Erysipelothris* spp. (G+), *Pseudomonas* spp. (G-), *Pasteurella* spp. (G-), *Haemophilus* spp. (G-), *Bacteroides* spp. (G- anaeróbico), *Brucella* spp. (anaeróbico) e *Mycoplasma* spp. As infecções mistas, freqüentemente observadas, são causadas pelas bactérias aeróbicas G - associadas às anaeróbicas, ou G+ aeróbicas (KASARI et al., 1988; TRENT & REDIC-KILL, 1997).

A dermatite digital papilomatosa (DDP), conhecida também como dermatite verrucosa corresponde a uma das enfermidades podais mais freqüentemente observadas em bovinos, é contagiosa, dolorosa e circunscrita ao dígito. As lesões iniciais são tipicamente avermelhadas, planas e ulceradas, e

posteriormente ampliam suas dimensões, apresentando um aspecto verrucoso com projeções papilares (WALKER et al., 1997; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001). As lesões ocorrem freqüentemente nos membros pélvicos e localizam-se na superfície plantar acima do espaço interdigital, adjacente aos bulbos dos cascos (WALKER et al., 1995; RODRIGUEZ-LAINZ et al., 1996b; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001).

Em virtude da grande suscetibilidade das lesões causadas pela DDP, via de regra são observadas espiroquetas invadindo o estrato espinhoso e papilas dérmicas, sugerindo que estas bactérias desempenhem um importante papel na patogenia da doença. Este quadro pode ser exacerbado no momento da aplicação do antimicrobiano no tecido afetado. (BRITT et al., 1996; BRITT et al., 1999; HERNANDEZ et al., 1999; LAVEN & PROVEN, 2000; BERRY, 2001; FAJT & APLEY, 2001; WALKER et al., 1995; DÖPFER et al., 1997; YERUHAM & PERL, 1998; BRITT et al., 1999; FAJT & APLEY, 2001).

O tipo de lesão acarretada pela DDP pode causar claudicação classificada como moderada a severa, resultando na diminuição da massa corporal e na redução da produção leiteira (WALKER et al., 1995; COULON et al., 1996; BRITT et al., 1999; OHYA et al., 1999; YERUHAM et al., 2000; BERRY, 2001). Uma das implicações da doença é a redução na ingestão de ração, além da diminuição nos sinais de estro e aumento do período compreendido entre o parto e a concepção.

Estudos epidemiológicos admitem que determinadas condições ambientais e de manejo possam predispor as novilhas leiteiras à doença. As condições que propiciam o aparecimento da doença são: o peso das novilhas, o tipo de piso (concreto) onde se encontram alojadas, a introdução de animais no rebanho e o casqueamento (CHELI & MORTELLARO, 1974; RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1996a; ARGAEZ-RODRIGUEZ et al., 1997; KOFLER, 1997; WELLS et al., 1999).

Desta forma, a DDP apresenta-se como uma doença multifatorial, onde a precária condição de higiene é determinante para a instalação da patologia, na qual as espiroquetas podem estar primariamente envolvidas (GRUND et al., 1995; KOFLER, 1997; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001; FAJT & APLEY, 2001).

Diversos pesquisadores constataram que a maioria das vacas acometidas de DDP, que receberam administração tópica de penicilina G, procaína, ceftiofur sódico, oxitetraciclina, lincomicina ou uma combinação de lincomicina e espectinomicina, seguida ou não de bandagens, responderam favoravelmente no período compreendido entre 7 a 30 dias após o término do tratamento. Entretanto, casos de recidivas das lesões foram observados em vacas previamente tratadas com antibióticos (BRITT et al., 1996; COULON & LESCOURRET, 1996; KOFLER, 1997; HERNANDEZ et al., 1999; OHYA et al., 1999; HERNANDEZ & SHEARER, 2000; LAVEN & PROVEN, 2000; FAJT & APLEY, 2001).

As opções de tratamento para tal patologia são limitadas e agravam-se ainda mais quando o processo infeccioso atinge os ossos e as articulações

(CLARKSON et al., 1996; DESROCHERS et al., 1995; KOFLER, 1995; NAVARRE et al., 1999; STANEK, 1994).

Os resultados insatisfatórios obtidos no tratamento das doenças podais em bovinos, através da administração parenteral de antimicrobianos, devem-se em parte à diminuição do pH tecidual causada pelos processos infecciosos, produção de enzimas proteolíticas pelas bactérias e células inflamatórias e devido à formação de coágulos de fibrina, favorecendo a permanência de microorganismos viáveis no seu interior. Outro ponto importante a ser considerado é que o tecido ósseo é composto por um tecido conectivo denso, caracterizado por um limitado suprimento sanguíneo e uma reduzida drenagem venosa e linfática (ORSINI, 1984; TRENT & REDIC-KILL, 1997).

A escolha de um fármaco de amplo espectro de ação bem como da sua concentração na região afetada torna-se fundamental para o sucesso do tratamento (FERGUSON; 1997; HONNAS et al., 1991; ORSINI, 1984; TRENT & REDIC-KILL, 1997).

Os prejuízos decorrentes da DDP são atribuídos aos custos do tratamento da enfermidade, além da necessidade de descarte do leite de animais em lactação, devido à presença de resíduos de antimicrobianos (BRITT et al., 1999).

Em 1997, GUARD efetuou um grande levantamento dos custos das principais doenças que acometem os rebanhos leiteiros na Inglaterra, e concluiu que em relação às doenças do casco, as principais razões que levam à perda econômica são o aumento do descarte dos animais, diminuição da produção de

leite e redução dos índices reprodutivos. Nesse estudo, as doenças de casco foram divididas em três categorias: lesões interdigitais, digitais e lesões que acometem a sola, tais como as úlceras na sola; os custos por animal afetado foram: R\$293,00, R\$520,00 e R\$940,00, respectivamente. Assim, a conclusão obtida é a de que as lesões interdigitais apresentam o menor custo pois acarretam apenas as despesas diretas, de tratamento, moderada perda de peso e produção, já as lesões digitais além das despesas diretas afetam também o desempenho reprodutivo. Os maiores custos recaem nas lesões da sola, associadas à laminite, pois muitas vezes acarretam o descarte do animal e até mesmo sua morte (GUARD, C. *apud* SHIRLEY, R. Trim your cost. **Dairy Herd Management**, .v.Dez., p.16- 7, 1997).

No congresso da Associação Americana de Profissionais em Bovinos (AABP) (DIAS, 2000), foi apresentado um estudo realizado com 5.000 vacas leiteiras, em que foram observadas as perdas decorrentes de lesões de casco associadas à laminite (hematoma de sola, úlcera de sola, abscesso de sola, solas duplas e doença da linha branca). Os resultados indicaram que 13,9% dos animais (702 vacas) apresentaram lesões associadas à laminite, sendo que destes animais 44% foram descartados. As vacas acometidas dessa doença apresentaram uma taxa de descarte 1,77 vezes maior que as vacas acometidas com lesões de casco, porém não associadas à laminite. Observou-se ainda, que dentre as vacas descartadas devido a problemas reprodutivos, 20,4% estavam também acometidas com lesões na sola, associadas à laminite, evidenciando a associação entre estes dois problemas.

Os dados apresentados acima são importantes para destacar a relevância dos estudos e pesquisas concernentes à doença do casco em bovinos. Entretanto,

cada rebanho representa uma realidade, e devem ser implementados protocolos de controle e prevenção adequados, visando minimizar os prejuízos dessa doença ao agronegócio.

Os prejuízos causados pela DDP devem ser estimados pelo agricultor calculando a incidência desta doença em seu rebanho, o tipo de lesão observada, e as respectivas limitações acarretadas pela gravidade dos sintomas clínicos da doença.

BERMUDEZ et al. (1992) relata que apesar da pouca importância dada para as afecções podais no rebanho nacional, os dados observados em outros países comprovam que as perdas atingem 10% da produção leiteira. Estes autores citam que no Reino Unido foram constatadas perdas de aproximadamente 35.000.000 libras anuais, e na Áustria observou-se uma perda de U\$42,90 para cada bovino com afecções podais. SILVA et al. (2001), constata que os problemas podais podem comprometer em até 20% da produção leiteira e 25% da produção de carne.

A terapia antimicrobiana acarreta a presença de resíduos em leite, os quais devem ser inferiores aos limites máximos de resíduos (LMRs) para consumo humano, fazendo-se necessária a observância do período de carência, que varia dependendo do agente antimicrobiano e das doses utilizadas (HADDAD et al., 1986a; HADDAD et al., 1986b; BROWN et al., 1986; TYCZKOWSKA et al., 1993; STANEK, 1994; PEDERSOLI et al., 1995; MORCK et al., 1998; CHERLET et al., 2000).

Os LMRs são caracterizados como a concentração máxima de resíduo no alimento que é legalmente aceito, sendo expresso em ppb (partes por bilhão). Estes valores devem garantir a segurança do produto de origem animal (PALERMO-NETO, 2001).

O LMR está relacionado com a dose de ingestão diária aceitável (IDA) do agente antimicrobiano, que corresponde ao que pode ser ingerido diariamente durante toda a vida do indivíduo sem que acarrete riscos a sua saúde. Estes valores são constantemente atualizados de acordo com o estado da arte nesta área. O valor da IDA é expresso em miligramas (mg) do agente tóxico por kilo (Kg) de peso corporal e é obtido dividindo-se o NOEL (dose na qual não se observa efeito) em ensaios de experimentação animal.

Os LMRs dos antibióticos para a matriz leite correspondem a um décimo daqueles definidos para carnes, uma vez que o leite é o principal alimento da dieta de crianças e recém-nascidos, sendo preconizado pela OMS como indispensável até os nove meses de vida da criança. Assim, recomendam-se valores mínimos residuais de medicamentos veterinários nesta matriz nutricional (FONSECA & SANTOS, 2001).

O Codex Alimentarius, a Food and Agriculture Organization (FAO) da Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinam os limites máximos permitidos, ou LMRs para substâncias de uso veterinário em alimentos. Estes limites são fundamentais ao comércio internacional de alimentos a fim de assegurar que os produtos importados ou exportados sejam seguros à saúde humana (FONSECA & SANTOS, 2001).

No Brasil, o Ministério da Agricultura através do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), sistematiza os meios de controle da presença de resíduos de compostos químicos utilizados na produção de alimentos agropecuários. Este programa estabelece 100 ppb como LMR para o total das tetraciclina em leite (BRASIL, 1998).

Assim, tanto a eficácia do princípio ativo quanto a sua presença residual em leite são os fatores que devem ser levados em consideração na escolha da terapia da DDP. Os custos envolvidos e técnicas de manuseio do antibiótico também são considerados pelo produtor de leite, uma vez que podem comprometer consideravelmente o custo final do seu produto.

O tratamento de vacas leiteiras acometidas de DDP pode ser realizado com tetraciclina, mais especificamente com oxitetraciclina que é um antibiótico que apresenta um amplo espectro de ação bacteriostática. Esta classe de antimicrobianos é eficaz, de fácil administração e baixo custo, além de apresentar grande versatilidade na incorporação de diversas formas farmacêuticas, que permitem que sejam utilizadas tanto como aditivo em ração animal, como em formulações parenterais no tratamento de processos infecciosos. Existem diversas formulações de injetáveis de oxitetraciclina utilizadas na medicina veterinária (Compêndio Veterinário, 2002). A diferença entre estas preparações, relacionadas aos excipientes presentes na formulação afetam a disponibilidade do ingrediente ativo no local da lesão, além dos parâmetros farmacocinéticos e toxicocinéticos concernentes aos valores residuais em leite.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo determinar as concentrações de oxitetraciclina por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE) em líquido sinovial, plasma e leite de vacas portadoras de doenças podais, tratadas através de aplicações múltiplas com oxitetraciclina por via intramuscular e por via tópica. Adicionalmente serão também comentadas a eficácia destes tratamentos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Agentes anti-microbianos

Várias substâncias são utilizadas no combate aos microorganismos, com ações específicas ou inespecíficas sobre os agentes patógenos. Os anti-sépticos e os desinfetantes são os principais representantes dos agentes inespecíficos, que atuam sobre os microorganismos em geral, quer sejam patogênicos, ou não. Os antibióticos e os quimioterápicos são considerados como específicos, por agirem diretamente sobre os organismos causadores da patogenia (SPINOSA, 2006-b).

Os antibióticos são substâncias produzidas por diferentes espécies de microorganismos, tais como bactérias, fungos e actinomicetos que suprimem o crescimento de outros microorganismos e podem até mesmo destruí-los (CHAMBERS, 2001-a).

A principal diferença entre os quimioterápicos e antibióticos está relacionada ao modo de obtenção da substância química. Aquelas produzidas por organismos vivos são denominados antibióticos, enquanto os agentes sintetizados em laboratório correspondem aos quimioterápicos. Há ainda aqueles que são produzidos parcialmente por microorganismos e concluídos em laboratórios, sendo denominados antibióticos semi-sintéticos (ALTERTHUM, 1999).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com diversos critérios, como:

- estrutura química: derivados de aminoácidos, açúcares, etc;
- ação biológica: bactericida, bacteriostático, entre outros;
- espectro de ação: gram-negativos, gram-positivos, amplo espectro, etc;
- mecanismo de ação: atuação na parede celular, na síntese de ácidos nucleicos, na membrana celular, entre outros.

Com relação aos quimioterápicos, estes são classificados segundo a sua estrutura química, como as quinolonas, os nitrofuranos, e as sulfas, entre outros e uso terapêutico, como os antivirais, e os antifúngicos, entre outros (SPINOSA, 2006-b).

2.2. Tetraciclina e a oxitetraciclina

As tetraciclina foram descobertas a partir de análises de amostras de solo provenientes de diferentes partes do mundo. A primeira delas foi isolada em 1948 por Benjamin Duggar e denominada clortetraciclina, seguida, dois anos mais tarde, da oxitetraciclina (OTC). A tetraciclina foi sintetizada em 1952, a partir do conhecimento da estrutura química dessa classe de compostos. Outros compostos dessa família de estruturas químicas semelhantes, que não contém o grupo característico CH_3 ligado ao anel carboxiamida, foram sintetizados em laboratório, tais como a demeclociclina, metaciclina e a doxiciclina (CHAMBERS, 2001-b).

As tetraciclina são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, sendo algumas semi-sintéticas. São formadas por quatro anéis daí originando sua denominação. Esses compostos são eficazes contra

bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de Riquétsias e Clamídias intracelulares (DENOBILE, 2002, TORTORA, 2000, SPINOSA, 2006-a).

Desta família uma das mais utilizadas é a oxitetraciclina (OTC), cujo nome químico, de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemists) é: (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-dimetilamino-1, 4, 4*a*, 5, 5*a*, 6, 11, 12*a*-octahidro-3, 5, 6, 10, 12, 12*a* -hexahidroxi-6-metil-1, 11-dioxonaftaceno-2-carboxamida e pelo CAS (Chemical Abstracts System) é: (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-octahidro-3,5,6,10,12,12*a*-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenocarboxamida. Seu número de registro junto ao CAS (Chemical Abstracts Service) é 79-57-2, e sua fórmula química é C₂₂H₂₄N₂O₉.

A Figura 1 ilustra a estrutura da oxitetraciclina

Figura 1. Estrutura química da oxitetraciclina.

A oxitetraciclina é muito utilizada em função de seu amplo espectro de ação antibacteriana, sendo uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Brucella* e *Spirochaetaceae*.

A família das tetraciclinas é ainda freqüentemente utilizada em medicina veterinária, em nutrição animal e em aditivos alimentares destinados ao uso pecuário (COUTO, 2000).

2.2.1. Farmacocinética

Quando administrada por via oral, as tetraciclinas são parcialmente absorvidas no trato gastrointestinal, sendo que a presença de alimentos diminui a sua absorção (SPINOSA, 2006-a, TORTORA, 2000).

A absorção ocorre, em sua maior parte, no estômago e intestino delgado superior, sendo mais acentuada quando o indivíduo se encontra em jejum; e é menos eficiente nas porções inferiores do trato intestinal. A absorção destas substâncias é alterada na presença de produtos lácteos, bicarbonato de sódio, sais de cálcio e magnésio, preparações à base de ferro e hidróxido de alumínio. O provável mecanismo de interação destas substâncias com a oxitetraciclina são o aumento do pH gástrico e a subsequente quelação (CHAMBERS, 2001-b).

A oxitetraciclina não é totalmente absorvida, é após uma única dose oral, as concentrações plasmáticas máximas são obtidas entre duas a quatro horas. Apresenta meia-vida na faixa de 6 a 12 horas, e com freqüência, são administradas duas a quatro vezes por dia. A administração de 250 mg a cada seis horas produz concentrações plasmáticas máximas de aproximadamente 3 µg/mL (CHAMBERS, 2001-b).

Com relação à distribuição, as tetraciclina são amplamente distribuídas por todo o organismo, sendo que os seus volumes de distribuição dependem da lipossolubilidade destes antibióticos e das diferentes taxas de ligação às proteínas plasmáticas. As porcentagens de ligação protéica para a tetraciclina e a oxitetraciclina são, respectivamente, cerca de 65% e de 20 a 40 % (CHAMBERS, 2001-b).

A oxitetraciclina liga-se às proteínas plasmáticas na proporção de 27 a 35%, tendo uma boa difusão intra e extra-celular. É distribuída amplamente pelos tecidos, ossos e dentes, porém é pouco distribuída pelas meninges e líquido encefalo raquidiano. É excretada por secreção biliar, sendo que a concentração biliar corresponde à cerca de 5 a 6 vezes a concentração sérica, e pode passar pelo ciclo entero-hepático. Atravessa a barreira placentária e é eliminado no leite. Além disso, tende a ligar-se a células tumorais e tecidos inflamatórios crônicos necrosantes, e sua característica fluorescência em luz ultravioleta pode ser utilizada no diagnóstico de carcinomas e outras doenças degenerativas (BIAM, 2006).

Esses compostos são distribuídos pelo organismo e concentram-se no fígado e rins após a administração oral ou intravenosa (TIMONEY, 1984).

As concentrações encontradas no líquido sinovial e na mucosa do seio maxilar assemelham-se às plasmáticas. As tetraciclina são armazenadas nas células dos retículos endoteliais, baço e medula óssea, bem como nos ossos, na dentina e no esmalte dos dentes (CHAMBERS, 2001-b).

As tetraciclinas são biotransformadas pelo fígado e excretadas na bile, onde são parcialmente reabsorvidas. Observa-se no fígado uma concentração três a cinco vezes superiores às encontradas no plasma. De acordo com YAO & MOELLERING, 1995 a oxitetraciclina é biotransformada pelo fígado e concentrada na bile e também acumula-se no sangue de pacientes com insuficiência hepática ou obstrução biliar.

A excreção das tetraciclinas ocorre através da urina e fezes, sendo que a via renal constitui-se na mais importante, onde a depuração é realizada através da filtração glomerular. A maior parte da oxitetraciclina é excretada por via urinária, onde 75% são eliminados em sua forma ativa (SPINOSA, 2006-a, BIAM, 2006).

Em virtude da absorção intestinal incompleta, estas substâncias aparecem nas fezes em concentrações variáveis. A eliminação pelo trato intestinal, devido à excreção biliar ocorre, também, após a administração parenteral das tetraciclinas (CHAMBERS, 2001-b).

Em pacientes com problemas renais observa-se o aumento da meia-vida das tetraciclinas, com exceção da doxiclicina que apresenta 90% de excreção nas fezes, na forma de um conjugado ativo (YAO & MOELLERING, 1995).

2.2.2. Farmacodinâmica

Para o entendimento do mecanismo de ação das tetraciclinas é necessário conhecer a diferença entre os ribossomos dos microorganismos e dos animais superiores. Nos primeiros, o ribossoma é constituído das subunidades 30 e 50S, enquanto nos segundos pelas subunidades 40 e 60S. Assim, nos microorganismos, as tetraciclinas agem inibindo a síntese protéica, ligando-se preferencialmente às subunidades 30S, impedindo que os RNA transportadores (RNAt) se fixem aos ribossomas. Desta forma, não ocorre incorporação dos aminoácidos na cadeia polipeptídica. As tetraciclinas por não apresentarem especificidade à subunidade 30S do microorganismo, também podem se ligar às subunidades 40S dos animais superiores, o que explica alguns dos efeitos adversos provocados por esta classe terapêutica (ALTHERTHUM, 1999; CHAMBERS, 2001-b).

Assim, estes compostos possuem efeito bacteriostático, uma vez que inibem a síntese protéica dos microorganismos. Em alguns microorganismos podem também apresentar efeito bactericida (SADICK, 2000).

Estes compostos primeiramente chamados de “amplo espectro”, há décadas vem sendo amplamente utilizados como agentes bactericidas, tanto na medicina humana quanto na veterinária. Entretanto, recentemente, estudos clínicos indicam resistência bacteriana às tetraciclinas. Estas primeiramente se ligam à subunidade 30 S dos microorganismos, inibindo a síntese protéica e bloqueando o sítio de ligação com o RNA transportador aminoacilada (aa-tRNA) ao sítio A. Parece, entretanto, que a ligação inicial de um complexo ternário de EF-Tu com o RNAt transportador (RNAt) ao sítio A e o

processo de decodificação não são afetados, uma vez que a hidrólise ribossomo GTP dependente não é afetada pelas tetraciclinas. Aparentemente, esta classe de antimicrobianos não tem efeito na ligação ao RNAt do sítio P exceto durante a iniciação do fator dependente. Coerente também com a inibição da ligação do RNAt ao sítio A durante a translação, as tetraciclinas também previnem a ligação de ambos fatores RF-1 e 2 durante a terminação, apesar da parada do códon (BRODERSEN et al, 2000)

A Figura 2 ilustra as interações entre as tetraciclinas e os ribossomos.

Figura 2. Mecanismo de ação dos antibióticos na síntese protéica.

Adaptado de CHAMBERS, 2001-b

2.2.3. Efeitos Adversos

As tetraciclinas podem causar vários efeitos adversos como: distúrbios gastrintestinais, deposição no tecido ósseo e dentário, alterações hepáticas e renais. No trato gastrintestinal produz irritação local direta, causando desconforto abdominal, náusea e vômitos, e é pouco comum o aparecimento de diarreia (CHAMBERS, et al, 2000).

Em virtude do seu amplo espectro de ação, pode modificar a flora intestinal, levando à distúrbios gastrintestinais e infecção causadas por *Cândida albicans* e, conseqüentemente, a superinfecções (TORTORA, 2000).

A demeciclina, a doxiciclina e em menor escala os outros derivados da tetraciclina podem produzir diversos graus de reações cutâneas em pacientes expostos a radiação solar. Este tipo de efeito é considerado como uma reação fototóxica (CHAMBERS, et al, 2000). Estas reações de hipersensibilidade são raras, sendo que a fotossensibilibilidade consiste em erupções eritematosas e parece ser decorrência do acúmulo destas substâncias na pele (YAO & MOELLERING, 1995).

As tetraciclinas comprometem a função hepática, sobretudo durante a gestação, ou em pacientes com insuficiência hepática preexistente e atividade renal diminuída, ou ainda, quando são administradas altas doses por via intravenosa (superiores a 2g por dia em humanos) (TIMONEY, 1984). Dentre as tetraciclinas, a oxitetraciclina e a tetraciclina apresentam menor ação hepatotóxica (CHAMBERS, 2001b).

As tetraciclina também podem provocar a pigmentação castanha dos dentes, e observa-se que quanto maior a dose, mais intensa é a pigmentação do esmalte. Pode haver pigmentação permanente se o composto for absorvido entre o segundo mês de gestação até os cinco anos de idade, quando os dentes são calcificados (CHAMBERS, 2000). Este efeito adverso é permanente e pode ser associado à hipoplasia do esmalte dentário e manchas nos dentes decíduos, não sendo, desta forma, aconselhável a utilização destes compostos durante a gravidez, ou em crianças de até 8 anos de idade (SILVA, 2002).

Em virtude das tetraciclina se ligarem ao cálcio, elas podem provocar efeitos cardiovasculares, representados pelas arritmias (SPINOSA, 2006-a).

Também são relatados casos de inibição no crescimento ósseo, micromelia e sindactilia, como exemplos de lesões fetais, em virtude do uso das tetraciclina durante a gestação (SILVA, 2002).

A administração intravenosa de tetraciclina costuma ser acompanhada de tromboflebite, especialmente quando se utiliza uma única veia para infusões repetidas. Os efeitos extremamente irritantes dessas drogas manifestam-se pela intensa dor que produzem quando injetadas por via intramuscular sem anestésico local (CHAMBERS, 2000-a).

2.2.4. Uso das tetraciclina na medicina veterinária e a sua associação às infecções podais

As tetraciclina podem ser administradas tanto por via parenteral como por via oral, entretanto as doses terapêuticas por via oral não são utilizadas em

ruminantes e eqüinos em virtude das alterações da microflora do trato digestório (SPINOSA, 2006-a; TIMONEY, 1984).

A dose recomendada de oxitetraciclina para cães e gatos é de 10 mg/kg por via intravenosa e intramuscular de 12 em 12 horas, ou de 20 mg/kg, por via oral, com o mesmo intervalo posológico. Nos eqüinos a dose é de 3-5 mg/Kg, por via intravenosa de 12 em 12 horas. Em ruminantes, a dose é de 10 mg/kg, intramuscular ou intravenosa a cada 12 ou 24 horas, segundo critério do médico-veterinário. Com relação aos suínos, a dose recomendada é de 10 mg/kg, por via intravenosa a cada 12 ou 24 horas (SPINOSA, 2006-a).

A administração intramuscular das tetraciclinas é limitada devido à irritação tecidual e resposta inflamatória local, e por esta razão, a administração intravenosa ou por via intramamária são mais frequentemente recomendadas e empregadas em medicina veterinária. (TIMONEY, 1984).

As tetraciclinas correspondem a um dos grupos de fármacos mais utilizados no tratamento de mastite, atingindo uma boa concentração na glândula mamária quando administrados por via parenteral. A oxitetraciclina é recomendada no tratamento da mastite causada por *Pasteurella haemolytica* e *Aerobacter aerogenes*. As tetraciclinas de “longa duração”, na dose de 20 mg/Kg, são capazes de manter uma ótima concentração plasmática de até 72 horas, com período de carência para o consumo do leite de 96 horas após a última aplicação. A doxiciclina é utilizada em casos de mastite de difícil tratamento, como aquelas causadas por *Nocardia spp* e *Clamidia* (COSTA, 1996), constituindo-se também de um potente agente eficaz contra *Pasteurella haemolytica* em bovinos no tratamento de pneumonia (MEIJER et al, 1993).

Na espécie bovina, a maior parte das claudicações é originada de doenças podais onde é freqüente a presença de microorganismos (CLARKSON et al., 1996; DESROCHERS et al., 1995; KOFLER, 1995; NAVARRE et al., 1999; STANEK, 1994).

Nas doenças podais observam-se a ocorrência tanto de bactérias Gram positivas quanto negativas. A *Actinomyces pyogenes*, uma bactéria Gram negativa, aeróbica facultativa, é a mais comum em casos de infecções podais, seguida respectivamente de *Streptococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Porteus spp.* e *Fusobacterium necrophorum*. Menos comuns, mas não improváveis são os *Staphylococcus spp.*, *Erysipelothris spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pasteurella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Bacteróides spp.*, *Brucella spp.* e *Mycoplasma spp.* (TRENT & REDIC-KILL, 1997).

A escolha do antibiótico adequado deve considerar os microorganismos que acometem a região lesada. Assim, neste tipo de patologia deve-se optar por um antibiótico de amplo espectro de ação. O sucesso do tratamento está diretamente associado à concentração do fármaco na região afetada. Desta forma, a fim de se evitar a prolongada utilização sistêmica dos referidos antibióticos, foram desenvolvidas algumas técnicas de terapia local, como, por exemplo, o implante de esferas ou esponjas, contendo o fármaco no interior da articulação (BUTSON et al., 1996; HISBRUNNER & STEINER, 1998; TROSTLE et al., 1996) ou até mesmo a administração intra-articular de antimicrobianos (BERTONE et al., 1987; LLOYD et al., 1988; LLOYD et al., 1990).

Os insucessos obtidos nos tratamentos das doenças podais dos bovinos, utilizando a administração parenteral de antimicrobianos, ocorrem em parte pela diminuição do pH tecidual causada pelos processos infecciosos, pela produção de enzimas proteolíticas pelas bactérias e células inflamatórias e à formação de coágulos de fibrina que favorecem a permanência de microorganismos viáveis no seu interior. Outro aspecto que deve ser considerado é que o tecido ósseo é composto por um tecido conectivo denso, caracterizado por um limitado suprimento sangüíneo e reduzida drenagem venosa e linfática. Assim, a escolha do antimicrobiano deve basear-se na sensibilidade microbiana à substância além das suas características farmacocinéticas, devendo recair em uma substância de amplo espectro de ação e capaz de atingir elevadas concentrações nos diversos tecidos acometidos da infecção podal (FERGUSON, 1997; HONNAS et al., 1991; ORSINI, 1984; TRENT & REDIC-KILL, 1997).

Rule et al, 2001 realizou um estudo comparando o perfil farmacocinético e o valor residual em leite de oxitetraciclina de cabras em lactação mediante a utilização de duas formulações comerciais à base de cloridrato de oxitetraciclina administradas por via intramuscular (formulação convencional e longa duração) e intravenosa (formulação convencional). Para tal, cinco animais foram tratados com uma única dose de oxitetraciclina de 20mg/Kg pela via intravenosa e intramuscular (formulação convencional), e 3 semanas após administrou-se nos mesmos animais a formulação de longa duração, na mesma dosagem. A análise de oxitetraciclina foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e foram observados valores plasmáticos similares entre as duas preparações farmacêuticas. Em relação à presença de resíduos do antibiótico no leite, estes foram observados por dois e três dias

após a administração das formulações convencionais e de longa duração, respectivamente, indicando que o leite não deveria ser utilizado para consumo humano durante este período.

Nouws et al., 1983 trabalharam com três grupos de vacas de 3, 12 e 14 semanas de idade que receberam doses intramusculares de oxitetraciclina nas concentrações de 7,54; 6,88 e 17 mg/kg pc, respectivamente, e dois grupos de vacas em lactação ou não que receberam 3,32 e 7,94 mg/kg pc, respectivamente. Amostras de sangue foram coletadas e as concentrações de OTC foram determinadas por difusão em ágar, medindo-se a formação do halo de inibição do crescimento bacteriano. O volume de distribuição nos animais do primeiro grupo de três semanas foi de 2,48 L/kg, duas a três vezes maior que nos do segundo grupo. A meia vida biológica foi de $13,5 \pm 3,6$ horas e $8,8 \pm 0,52$ para os animais de três a doze semanas, respectivamente. A dose e o estado de lactação não afetaram o volume de distribuição ou a meia vida de biológica no segundo grupo.

Em outro estudo realizado pelos mesmos autores, vacas leiteiras foram tratadas por via intravenosa e intramuscular com diferentes formulações de OTC a 10% (dose 5 mg/kg pc) e amostras de sangue e urina foram coletados. O volume de distribuição foi de $1,00 \pm 0,18$ L/kg e não houve diferenças entre as formulações. As concentrações plasmáticas foram de $2,28 \pm 0,15$ µg/mL 7 horas após a injeção i.m. A meia vida plasmática foi de $9,02 \pm 0,88$ horas. A maior parte foi excretada pelos rins (85-86%) e uma pequena porção pela bile (2%) (NOUWS et al., 1985 apud IPCS, 1998).

MEVIUS et al, 1986, apud IPCS, 1998 realizou um estudo em que cinco vacas leiteiras foram tratadas com injeções únicas de 5 diferentes formulações de 20% OTC em doses de 10 mg/kg pc. As concentrações de OTC no plasma, a eliminação renal de OTC e creatinina foram determinadas, por ensaio microbiológico, cuja sensibilidade era de 0,05 mg/L. As concentrações plasmáticas máximas foram atingidas em cinco a dez horas após tratamento e variaram entre 4,6 a 6,8 µg/mL dependendo da formulação. As concentrações plasmáticas que excederam 0,5 µg/mL foram mantidas por quarenta e oito a setenta e duas horas dependendo da formulação. A média da depuração renal foi de 0,062 l/kg/hora. A recuperação em plasma da OTC até setenta e duas horas variou de 61,7 a 88% da dose administrada.

O tratamento específico da doença de casco em gado bovino é realizado através da administração de 500 a 1.000 mg de tetraciclina por via intravenosa regional. Estudos clínicos comprovaram a sua eficiência no tratamento, corroborados através dos sinais clínicos e em virtude da redução do período de recuperação, após a administração intravenosa ou intramuscular da tetraciclina. Alguns dos efeitos indesejáveis observados neste procedimento são o edema moderado, sinais de inflamação e formação de hematomas especialmente no local da aplicação e na dose de 1000 mg (HAUCK-BAUER, 1977; STANEK, 1994). Em um estudo realizado por Stanek (1994), dois dentre 15 animais tratados com 10.000.000 U.I. de penicilina cristalina G sódica apresentaram os mesmos efeitos adversos além da presença da trombose venosa extensa distal ao torniquete.

Dependendo da severidade do quadro clínico da DDP, pode-se curar a infecção através da terapia local, terapia sistêmica ou uma combinação de

ambas. Os casos iniciais de infecção podem responder a um tratamento do local com limpeza, remoção do tecido necrótico na área interdigital e uma aplicação de anti-sépticos ou antibióticos cobertos com ataduras. Os bovinos afetados devem ser mantidos em ambiente seco até que a infecção seja debelada. Os casos mais graves devem ser tratados com terapia sistêmica. Mesmo que se empreguem antimicrobianos sistêmicos, a limpeza, o debridamento, a proteção podal e a manutenção de um ambiente seco aceleram a cicatrização das lesões (REBHUN, 2000).

2.2.5. Determinação da oxitetraciclina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A oxitetraciclina apresenta estrutura contendo quatro anéis conjugados parcialmente com um grupo funcional carboxiamida. Corresponde a um composto anfótero, com valores de pH característicos, solúveis em solventes orgânicos polares ou moderadamente polares e formam sais e hidratos cristalinos com ácidos e bases. Além disso, também têm a habilidade de formar complexos fortes com cátions multivalentes. Os espectros de UV visíveis apresentam marcada absorção em torno de 270 e 360 nm em soluções ácidas e neutras (FEDENIUK & SHAND, 1998; OKA et al, 2000). Desta forma, na sua detecção utilizam-se comprimentos de onda na região do UV (OKA et al, 2000).

Uma vez que as tetraciclina vêm sendo utilizadas desde meados do século XX, tanto na terapêutica humana, quanto na animal, muitos são os métodos analíticos publicados que permitem sua determinação e quantificação. O uso das tetraciclina pela comunidade veterinária propiciou a publicação de ótimas

revisões sobre o tema (OKA, et al, 1998; OKA, et al, 2000; SCHENCK & CALLERY, 1998; FEDENIUK & SHAND, 1998; BARKER & WALKER, 1992 e ANDERSON, et al, 2005). Esses textos indicam que a identificação e a quantificação dos resíduos de oxitetraciclina em leite é freqüentemente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A família das tetraciclina possui diferentes grupos funcionais na sua molécula cuja presença torna ainda mais complexos os mecanismos envolvidos na sua retenção nos sistemas cromatográficos. Como consequência da elevada polaridade das tetraciclina são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso. Em tais sistemas solventes, desempenham papel importante, a formação de pares iônicos, de complexação e a forte interação com grupos silanóis residuais. Estes fatores dificultam a quantificação das tetraciclina (PENA et al, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) corresponde à técnica mais utilizada para a determinação de tetraciclina em leite (SCHENCK & CALLERY, 1998; CINQUINA et al, 2003), entretanto, a necessidade de medir o teor de tetraciclina em leite em concentrações de partes por bilhão tem sido investigada por meio da transformação de Fourier na faixa do infravermelho e através de técnica espectroscópica na região próxima ao infravermelho (SIVAKESAVA & IRUDAYARAJ, 2002). Além desta técnica, testes de inibição microbiana também são utilizados na determinação de resíduos antimicrobianos em leite, porém a sensibilidade destes métodos deve ser melhorada para a específica determinação de resíduos de derivados tetraciclínicos (ALTHAUS, 2003).

Silva Jr. et al, 2004 preconiza a determinação de tetraciclinas em medicamentos veterinários utilizando análise por injeção de fluxo (FIA) com detector de fluorescência, onde os comprimentos de onda de excitação e emissão do detector foram de 420 e 530 nm. Os parâmetros de validação foram considerados adequados para quantificar os princípios ativos em medicamentos para uso veterinário.

As tetraciclinas podem ser analisadas tanto por CLAE-DAD, por detector ultravioleta, como por fluorescência, e a escolha do detector mais adequado leva em consideração fatores importantes como a composição da fase móvel, separação de eventuais impurezas, a constante de dissociação em meio ácido, a natureza de cada solvente utilizado, a presença de metais na amostra (ANDERSON, et al, 2005).

Na análise cromatográfica desses compostos são utilizadas colunas de fase reversa, que permitem a retenção das tetraciclinas através de alguns mecanismos, como a formação de pares iônicos, locais de competição, locais ativos ou não, troca iônica e interação com grupos silanóis (PENA et al, 1997).

As tetraciclinas quelam-se com íons metálicos e ligam-se às proteínas, desta forma, recomenda-se a adição de ácidos fortes e agentes desproteinizantes na extração desses compostos, à partir de matrizes biológicas (FEDENIUK & SHAND, 1998). Além disso, estas substâncias podem adsorver-se nos grupos silanóis na coluna de fase reversa, tendendo a apresentar picos com caudas e baixa resolução. Estes problemas podem ser minimizados pela adição de ácido

oxálico na fase móvel e pelo uso de colunas de poliestirenodivinilbenzeno (OKA et al, 2000; SCHENCK & CALLERY, 1998).

Uma alternativa para evitar a formação destes complexos e sua adsorção nas colunas de fase reversa é adicionar outros ácidos na fase móvel, como por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido perclórico, e ácido tartárico (PENA et al, 1997).

A adição de agentes bloqueadores na fase móvel, como, por exemplo, o etilenodiaminatetracetato dissódico (EDTA) que atua como par iônico das tetraciclinas no intervalo de pH de 3 e 5, aumenta a eficiência na obtenção dos picos. Outros pares iônicos utilizados para minimizar a formação de complexos entre as tetraciclinas e os íons metálicos incluem: dietanolamina, etanolamina, heptanosulfonato de sódio, nitrato e compostos alquilamônio substituídos (PENA et al, 1997).

A espectrometria de massa também é utilizada como um método de detecção altamente sensível. Essa técnica permite confirmar a presença de tetraciclinas como resíduos em material biológico devido ao baixo limite de quantificação e especificidade; portanto um método que combine uma adequada separação destes compostos, em baixas concentrações e sua determinação por espectrometria de massa ofereceria uma vantagem significativa para a confirmação inequívoca destes resíduos. Embora a cromatografia líquida acoplada ao detector de espectrômetro de massa (LC-MS) pareça ser a mais adequada para esta proposta, a maioria das condições de cromatografia a líquido previamente descritas não podem ser diretamente aplicadas aos sistemas de LC-MS existentes, porque utilizam fases móveis contendo

compostos não voláteis, tais como o ácido oxálico e ácido cítrico a fim de melhorar a resolução cromatográfica. Essas fases quando utilizadas em LC-MS causam entupimento da interface e um acréscimo de depósitos na fonte de íons, impedindo que o equipamento seja operado por tempo prolongado (OKA et al, 2000, apud DENOBILE, 2002).

Em estudo realizado por Croubels et al, 2003 para determinar a estabilidade de drogas de uso veterinário em soluções e matrizes biológicas, foi utilizada a LC-MS para a determinação analítica na separação de oxitetraciclina e 4-epioxitetraciclina. Para tal, foram utilizadas uma bomba quaternária P4000, acoplada à um injetor automático AS3000 com um dispositivo de esfriamento a 5°C, todos da ThermoFinnigan. A coluna utilizada foi do tipo polimérica RP (PLRP-S (5µm, 250mm x 4,6 mm i.d.), combinada com uma pré-coluna de 5mm x 3,0 mm i.d), mantidas a 60°C. A fase móvel foi composta por Fase A: 0,5% de ácido fórmico; 0,001 M de ácido oxálico e 3% de tetrafurano em água e Fase B: tetrafurano 100% num fluxo de 1 mL/min. O gradiente da fase móvel foi de 100% da fase A até 22 min e 90% da fase A e 10% da fase B entre 22,1 e 30 min de corrida.

Lykkeberg, et al, 2004 descreve um método quantitativo de determinação de oxitetraciclina, por LC/MS/MS. Outra técnica de determinação eletroquímica de oxitetraciclina em medicamentos veterinários foi preconizada por Kurzawa & Kowalczyk-Marzec, 2004.

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivos:

- Comparar as concentrações de oxitetraciclina no plasma, líquido sinovial e leite frente à administração intramuscular e via dérmica do antimicrobiano;
- Determinar os valores residuais da tetraciclina no leite das vacas tratadas pelas vias intramuscular e dérmica durante e após o período de carência;
- Avaliar se os valores residuais de oxitetraciclina em leite estão dentro do LMRs considerados pela legislação brasileira atualmente vigente;

Para tanto foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Revisão bibliográfica relacionada aos seguintes aspectos: Administração de oxitetraciclina em bovino leiteiro pelas vias intramuscular e tópica; Ocorrência de resíduos deste antibiótico em leite; Metodologia empregada nas análises do líquido sinovial, plasma e leite.
- Padronização e validação de métodos para as determinações de tetraciclina em líquido sinovial, plasma e leite por CLAE e detector de diodo.
- Aplicação da metodologia proposta para a determinação de tetraciclina em amostras de leite, líquido sinovial e plasma de animais tratados com esta substância administrada por via intramuscular e tópica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e Grupos

Foram utilizadas 16 vacas em lactação, com idade variando de 3 a 10 anos, pesando entre 400 e 650 kg, apresentando DDP em pelo menos um dos membros pélvicos. Visando padronizar os grupos de animais, foram utilizadas vacas oriundas de uma única fazenda produtora de leite tipo A e que se encontravam no intervalo de lactação compreendido entre 200 e 365 dias pós-parto. Os animais foram mantidos nas mesmas condições na fazenda, alojados em barracão coberto com piso de cimento. Aos animais foram fornecidos, no período matutino e vespertino, diariamente, silagem de milho, sal mineral à vontade, ração comercial (fabricada pela empresa Socil, sob a marca Vilac Produção- Ruminantes[®], indicada para vacas em lactação) e caroço de algodão, e água “*ad libitum*”. As vacas foram rotineiramente ordenhadas duas vezes ao dia e todo o leite produzido durante o estudo até 72 horas após o término, foi descartado para consumo, sendo armazenadas apenas as amostras nos períodos considerados no experimento.

O protocolo utilizado, nos itens relativos à elaboração de coleta das amostras foi executado pelo médico veterinário Prof. Ass. Dr. Celso Antonio Rodrigues, da Unesp – Júlio de Mesquita Filho, campus de Araçatuba.

O protocolo experimental contemplava:

- Exame físico inicial dos animais
- Determinação do grau de claudicação (DESROCHERS et al., 2001) pré-tratamento e pós-tratamento

- Contenção do animal
- Identificação fotográfica e classificação da lesão
- Aplicação da Oxitetraciclina tópica e inserção de bandagem, nos animais selecionados para este tipo de tratamento
- Troca da bandagem a cada 48 horas
- Aplicação da Oxitetraciclina L/A injetável a cada 72 horas, nos animais selecionados para este tipo de tratamento
- Colheita de amostras de leite, líquido sinovial e sangue venoso em todos os animais
- Momentos das colheitas:
 - M0: imediatamente anterior à colocação da aplicação do antibiótico e inserção da bandagem ou da administração injetável, conforme cada caso
 - M1: 6 horas após administração
 - M2: 12 horas após administração
 - M3: 24 horas após administração
 - M4: 36 horas após administração
 - M5: 48 horas após administração (troca da bandagem)
 - M6: 60 horas após administração
 - M7: 72 horas após administração (administração injetável)
 - M8: 84 horas após administração
 - M9: 96 horas após administração (troca da bandagem)
 - M10: 108 horas após administração
 - M11: 120 horas após administração
 - M12: 132 horas após administração
 - M13: 144 horas após administração (troca de bandagem e administração injetável)
 - M14: 156 horas após administração

- M15: 168 horas após administração
- M16: 180 horas após administração
- M17: 192 horas após administração (troca da bandagem)
- M18: 204 horas após administração
- M19: 216 horas após administração
- M20: 228 horas após administração
- M21: 240 horas após administração (troca da bandagem)
- M22: 252 horas após administração
- M23: 264 horas após administração
- M24: 276 horas após administração*
- M25: 288 horas após administração*
- M26: 300 horas após administração*
- M27: 312 horas após administração*
- M28: 324 horas após administração*
- M29: 336 horas após administração*
- M30: 348 horas após administração*
- M31: 360 horas após administração*
- M32: 372 horas após administração*
- M33: 384 horas após administração*
- M34: 396 horas após administração*
- M35: 408 horas após administração*

*Somente Grupo 1 (11 dias após a última administração). A divisão dos animais em grupo 1 e 2 é caracterizada no item 4.2.

4.2. Procedimentos

Todos os animais foram pesados, identificados e examinados, momentos antes do início do tratamento, sendo também determinado o grau de claudicação, segundo a classificação de DESROCHERS et al., 2001 que varia de intensidade 0 (ausente) a 4 (decúbito) e as lesões da DDP foram classificadas em leve (1), moderada (2) e severa (3), baseando-se nos sinais e extensão da região comprometida (WALKER et al., 1995; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001).

Os animais foram contidos em brete tombador hidráulico móvel, utilizado para casqueamento e tratamento de enfermidades podais, sendo mantidos em estação durante os procedimentos, sem a necessidade de tranquilização. Após a contenção, as lesões foram identificadas, fotografadas e classificadas.

As vacas foram aleatoriamente divididas em dois grupos (Figura 3), sendo que os animais do Grupo 1 receberam doses de 10 mg/Kg de peso corporal de oxitetraciclina de longa ação, pela via intra-muscular por meio de agulha 40 x 1,2 mm e seringa plástica descartável, com intervalo de aplicação de 72 horas, totalizando 3 aplicações.

Os animais do Grupo 2 receberam uma dose inicial de 5g do produto comercial, contendo 22% de cloridrato de oxitetraciclina, associada à bandagem. A administração do antimicrobiano na forma de pó, sobre as lesões dos animais, foi realizada através de compressas de gaze e ataduras de crepe, sendo estas bandagens trocadas a cada 48 horas, totalizando seis trocas.

O local de aplicação do antimicrobiano do Grupo 1 (musculatura glútea e coxa, não ultrapassando o volume de 20 mL em cada aplicação) foi previamente higienizado com solução de álcool iodado à 0,4%.

O local de colheita de líquido sinovial foi a articulação do tarso do membro acometido nos animais de ambos os grupos. O local da artrocentese foi previamente submetido à tricotomia, seguida de anti-sepsia com solução de polivinil-pirrolidona-iodo (PVPI) a 10%.

As amostras de leite, líquido sinovial e plasma de cada um dos animais foram coletadas nos momentos (M0) descritos no item 4.1.

As coletas das amostras de leite, líquido sinovial e plasma, nos momentos M0, 72 horas (M7), 144 horas (M13), foram realizadas previamente à administração injetável de oxitetraciclina. A troca das bandagens contendo oxitetraciclina em pó foi feita a cada 48 horas e as coletas nos momentos supra citados realizadas antes das trocas das bandagens.

Cada uma das amostras de leite correspondendo a um volume de aproximadamente 50mL foi composta por frações retiradas eqüitativamente dos quatro quartos.

Todas as amostras de leite, líquido sinovial e plasma, coletadas dos animais foram acondicionadas em recipiente de polietileno devidamente higienizado para cada tipo de amostra e posteriormente armazenadas à temperatura de -20° C, objetivando o encaminhamento para realização da análise laboratorial.

No início do tratamento e no final do período de coleta, todos os animais foram submetidos a uma avaliação do grau de claudicação (DESROCHERS et al., 2001) e da extensão das lesões podais, baseando-se nos mesmos critérios inicialmente propostos.

A Figura 3 ilustra a divisão dos animais submetidos respectivamente aos tratamentos por oxitetraciclina intramuscular e tópica.

Figura 3. Esquema do tratamento dos animais submetidos à administração de cloridrato de oxitetratetraciclina intramuscular e tópica.

As análises das amostras dos substratos obtidos de acordo como o esquema ilustrado na Figura 3 foram realizadas de acordo com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.3. Material

4.3.1. Reagentes

- Ácido Oxálico, pureza 99,9%, solução a 0,01M - MERCK®
- Ácido tricloroacético, pureza 99,5%, solução a 80% em acetonitrila - MERCK®
- Acetonitrila Omnisolv, grau de pureza cromatográfica – EM Science®
- Metanol Omnisolv, grau de pureza cromatográfica – EM Science®
- Trietilamina para síntese MERCK®
- Padrão de cloridrato de oxitetraciclina, teor 98,2%, fornecido pela Vallé S.A. Indústria Veterinária
- Água Tipo 1 (Milli Q – resistividade > 16 megaOhm)
- Medicamento com princípio ativo o cloridrato de oxitetraciclina

4.3.2. Equipamentos

- Cromatógrafo à líquido de alta pressão Hewlett Packard®, modelo 1100, equipado com detector de arranjo de diodo, acoplado ao computador modelo Vectra XM, série 4-5/150, com ChemStation para integração e processamento dos cromatogramas.
- Coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60Å°, 4µm (3,9 x 150 mm)
- Balança analítica Sartorius Research – modelo R 200 D
- Agitador de tubos Fanem® - modelo 151/VC
- Ultra-som Thornton®
- Sistema de purificação de água Milli Q – Plus Millipore®
- Centrífuga universal 16A, HETTICH®

4.4. MÉTODOS

4.4.1 Método analítico para a determinação de oxitetraciclina em leite

O método analítico adotado para a determinação de oxitetraciclina no leite de vacas sob o tratamento foi o proposto por Furusawa (1999), modificado e validado no presente trabalho.

Para a construção da curva de calibração, utilizou-se leite UHT integral, semi-desnatado e desnatado de diversas marcas comerciais. As amostras de leite foram homogeneizadas e enriquecidas com oxitetraciclina em diferentes concentrações, no momento da análise.

4.4.1.1. Condições Cromatográficas

As amostras de leite oriundas do tratamento de vacas em lactação com oxitetraciclina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com as seguintes condições:

- Coluna Nova-Pak Waters[®] RP 8, 60 °A, 4µm (3,9 x 150 mm);
- Temperatura do termostato da coluna 35°C;
- Fluxo da fase móvel: 1,2 mL/min;
- Comprimento de onda: 363 nm;
- Tempo de corrida: 3,5 minutos;
- Gradiente da fase Móvel: Solução A: Ácido Oxálico 0,01M; Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1); Solução B: Acetonitrila 100%.

4.4.1.2. Procedimento analítico - análise de oxitetraciclina em leite

- Em um tubo de centrífuga foram adicionados 1000 μL da amostra de leite e 350 μL da solução de ácido tricloroacético a 80 % em acetonitrila;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Ultra-som por 10 min;
- Centrifugação a 2500 rpm (1600g) por 20 min;
- Filtração em membrana 0,45 μm , 13 mm;
- Injeção automática de 50 μL do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas no item 4.4.1.1.

O fluxograma da Figura 4 ilustra a marcha analítica da extração de tetraciclina em leite.

Figura 4. Marcha analítica utilizada na determinação da oxitetraciclina em leite.

4.4.2. Método analítico para a determinação de oxitetraciclina em plasma

4.4.2.1. Condições Cromatográficas

As amostras de plasma que foram obtidas a partir do tratamento de vacas em lactação com oxitetraciclina e analisadas por cromatografia líquida de alta pressão, nas seguintes condições:

- Coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60 °A, 4µm (3,9 x 150 mm);
- Temperatura do termostato da coluna 35°C;
- Fluxo da fase móvel: 1,2 mL/min;
- Comprimento de onda: 363 nm;
- Tempo de corrida: 3 minutos;
- Gradiente da fase Móvel: Solução A: Ácido Oxálico 0,01M ; Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1); Solução B: Acetonitrila 100%.

4.4.2.2. Procedimento analítico

- Em um tubo de centrífuga foram adicionados 1000 µL das amostras de plasma coletados e 350 µL da solução de ácido tricloroacético a 80 % em acetonitrila;
- Ultra-som por 10 min;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Centrifugação a 3500 rpm (1600g) por 15 min;
- Filtração em filtro com membrana 0,45µm, 13 mm;
- Injeção automática de 50 µL do filtrado no CLAE segundo as condições mencionadas no item 4.4.2.1.

A quantificação das amostras foi realizada através da confecção de uma curva de calibração descrita no item 4.4.4.2.

A Figura 5 ilustra a marcha analítica da extração de oxitetraciclina em plasma

4.4.3. Método analítico para a determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial

4.4.3.1. Condições Cromatográficas

As amostras de líquido sinovial que foram obtidas a partir do tratamento de vacas em lactação com oxitetraciclina e analisadas por cromatografia líquida de alta pressão, nas seguintes condições:

- Coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60 °A, 4µm (3,9 x 150 mm)
- Temperatura do termostato da coluna 35°C
- Fluxo da fase móvel: 1,2mL/min
- Comprimento de onda: 363 nm
- Tempo de corrida: 3 minutos
- Gradiente da fase Móvel: Solução A: Ácido Oxálico 0,01M ; Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1).

4.4.3.2. Procedimento analítico

- Em um tubo de centrífuga foram adicionados 500 µl das amostras de líquido sinovial e 500 µl da solução de ácido tricloroacético à 80 % em acetonitrila;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Ultra-som por 10 min;
- Centrifugação a 3500 rpm (1600g) por 25 min;
- Filtração em filtro com membrana 0,45µm, 13 mm;
- Injeção automática de 50 µL do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas no item 4.4.3.1.

A quantificação da oxitetraciclina das amostras foi realizada através da confecção de uma curva de calibração descrita no item 4.4.4.2.

O fluxograma referente à figura 6 ilustra a marcha analítica da extração de oxitetraciclina em líquido sinovial.

Figura 6. Marcha analítica da determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial.

4.4.4. Parâmetros de validação

4.4.4.1. Linearidade

A linearidade do método analítico corresponde à capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra, dentro de um intervalo especificado. É preconizado que seja determinado mediante a análise de, no mínimo, 5 concentrações

diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para a determinação do coeficiente de correlação, inserção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos e desvio padrão relativo (BRASIL, 2008).

Para o estudo deste parâmetro, amostras das diferentes matrizes biológicas foram adicionadas de solução-padrão de oxitetraciclina de forma a fornecer as concentrações descritas na Tabela 1 e analisadas em seis replicatas por procedimentos específicos descritos no item 4.4.1.2; 4.4.2.2.; 4.4.3.2.

Tabela 1- Intervalo dinâmico (ng/mL) das curvas de calibração de oxitetraciclina em diferentes matrizes biológicas, número de replicatas e procedimento analítico específico.

Matriz	C1	C2	C3	C4	C5	Análise item
Leite	50	500	1.000	2.000	5.000	4.4.1.2
Plasma	50	500	1.000	5.000	10.000	4.4.2.2
Líq. Sin.	50	500	1.000	2.000	5.000	4.4.3.2

4.4.4.2. Curva de calibração

Para o preparo das curvas de calibração foram adicionadas solução-padrão às amostras das diferentes matrizes biológicas para se obter concentrações conforme descrito na Tabela 2. Tais amostras, assim como os respectivos brancos foram submetidos aos procedimentos analíticos específicos, em três replicatas, conforme descritos nos itens 4.4.1.2; 4.4.2.2.; 4.4.3.2. A partir dos resultados dessas análises, as regressões lineares foram obtidas, usando-se então, as equações da reta para o cálculo de oxitetraciclina nas amostras. Esse processo foi realizado para obtenção da curva de calibração em cada lote de amostras (n=20).

Através da confecção de gráfico das concentrações versus a área do pico obteve-se a equação da reta, corroborando a linearidade dos pontos pertencentes à faixa dinâmica.

Tabela 2- Concentração de oxitetraciclina (ng/mL) utilizadas no preparo das curvas de calibração para as diferentes matrizes biológicas e número de replicatas.

Matriz	C1	C2	C3	C5	n
Leite	50	250	1.000	5.000	3
Plasma	50	1.000	5.000	10.000	3
Líq. Sin.	50	1.000	2.000	5.000	3

4.4.4.3. Limite de Detecção

Este parâmetro é estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base (BRASIL, 2008).

As análises para as concentrações determinadas como limite de detecção foram realizadas em seis replicatas conforme os procedimentos analíticos descritos nos itens 4.4.1.2; 4.4.2.2. e 4.4.3.2.

4.4.4.4. Limite de Quantificação

Estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Pode-se também utilizar a razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base, devendo-se especificar o método utilizado para a determinação do LQ (BRASIL, 2008).

As análises para as concentrações determinadas como limite de detecção foram realizadas em seis replicatas conforme os procedimentos analíticos descritos nos itens 4.4.1.2; 4.4.2.2.; 4.4.3.2.

4.4.4.5. Recuperação

A recuperação do método para a extração de oxitetraciclina nas três matrizes biológicas estudadas foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo oxitetraciclina foi submetida ao processo de

extração, em relação à concentração obtida quando a amostra, sem a presença do analito, foi submetida ao processo de extração e posteriormente, concentrações conhecidas de oxitetraciclina foram adicionadas ao extrato final.

A determinação da recuperação foi feita em seis replicatas de diferentes concentrações de cada matriz biológica estudada; para o leite e líquido sinovial foram utilizadas as concentrações de 50; 1.000 e 5.000 ng/mL e para o plasma foram de 50, 5.000 e 10.000 ng/mL.

A seguinte equação foi utilizada para determinar a porcentagem de recuperação (CHASIN et al, 1998)

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração de amostra (conc. extraída)}}{\text{Concentração branco adicionado (conc. não extraída)}} \times 100$$

4.4.4.6. Precisão

A precisão do método analítico corresponde ao parâmetro que avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta pode ser avaliada por condições de repetibilidade e/ou reprodutividade (BRASIL, 2008).

Para avaliar a precisão, amostras das matrizes biológicas estudadas foram enriquecidas com as mesmas concentrações de solução-padrão de oxitetraciclina descritas no estudo de recuperação do método (item 4.4.4.5.) e analisadas em 6 replicatas em um único dia para o estabelecimento da precisão intra-ensaio e em 3 dias consecutivos para a precisão interensaio.

4.4.4.7. Exatidão

Para o estudo da exatidão, que é a diferença entre o valor nominal da substância presente na amostra e o valor obtido no momento da análise (CHASIN et al, 1998), amostras das matrizes biológicas avaliadas neste trabalho foram enriquecidas com as mesmas concentrações de solução-padrão de oxitetraciclina descritas no estudo de recuperação do método e analisadas em seis replicatas, segundo o procedimento específico de análise para cada matriz descritos nos itens 4.4.1.2; 4.4.2.2.; 4.4.3.2.

A exatidão pode ser expressa como inexatidão do método através da equação matemática:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração Obtida} - \text{Concentração Nominal}}{\text{Concentração Nominal}} \times 100$$

4.4.4.8. Estabilidade do analito na amostra

As amostras das três matrizes biológicas estudadas foram enriquecidas com oxitetraciclina nas concentrações de limite inferior e limite superior das respectivas curvas de calibração (Tabela 1) e armazenadas em alíquotas por um período de 91 dias à -20°C (freezer), e posteriormente analisadas conforme procedimento descrito para cada matriz em seis replicatas. Esses valores foram comparados com as concentrações obtidas no tempo zero de armazenamento (CHASIN et al, 1994).

5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DAS MATRIZ BIOLÓGICAS COLETADAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE OXITETRACICLINA POR VIA DÉRMICA E INTRAMUSCULAR

As amostras coletadas durante o estudo foram analisadas segundo o procedimento específico de cada matriz biológica para a detecção de oxitetraciclina e a concentração foi expressa em ng/mL.

6. RESULTADOS

6.1. Leite

6.1.1. Método Analítico

6.1.1.1. Linearidade

A Figura 7 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de um *pool* de leite com as seguintes concentrações de oxitetraciclina: 50; 150; 250; 1.000 e 5.000 ng/mL. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise de seis replicatas.

Figura 7: Curva de linearidade da oxitetraciclina em leite e seu coeficiente de determinação

6.1.1.2. Limite de detecção

O limite de detecção do método usado na determinação de oxitetraciclina foi de 39 ng/mL com desvio padrão de 0,19 e coeficiente de variação de 16,03%.

6.1.1.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método utilizado foi de 50 ng/mL, com o desvio-padrão de 0,22 e coeficiente de variação de 10,65%.

6.1.1.4. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para oxitetraciclina encontram-se na Tabela 3, onde cada ponto corresponde à média de seis replicatas.

Tabela 3. Recuperação da oxitetraciclina em amostras de *pool* de leite, nas concentrações de 50, 1.000 e 5.000 ng/mL.

Concentração de oxitetraciclina em leite (ng/mL)	Recuperação *%	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)	p (T-student)
50	101,36	2,34	3,09	0,828
1.000	108,80	1,94	1,81	0,221
5.000	95,80	6,80	3,59	0,082

6.1.1.5. Precisão

O coeficiente de variação e respectivos desvios-padrão no estudo da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para as amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Precisão intra e inter ensaio do método analítico na determinação de oxitetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio-padrão.

Conc. de oxitetraciclina em leite (ng/mL)	Precisão intra-ensaio*		Precisão interensaio (3dias)*	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
50	8,70	0,19	14,97	0,29
1.000	4,11	24,19	6,70	39,66
5.000	4,14	11,53	11,32	30,28

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.1.1.6. Exatidão

A exatidão do método, sendo representada pela tendenciosidade, ou seja, inexatidão, foi avaliada através da análise em dez replicatas das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina nas concentrações de 50, 1.000 e 5.000 ng/mL e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Inexatidão do método analítico para a determinação do oxitetraciclina em leite

Concentração de oxitetraciclina em leite (ng/mL)	Inexatidão (%)*
50	-0,53
1.000	-11,96
5.000	-3.01

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.1.1.7. Estabilidade

Os resultados do estudo de estabilidade das amostras de oxitetraciclina nas concentrações 50 e 10.000 ng/mL após 90 dias em freezer , são apresentados na Tabela 6. As concentrações obtidas se referem à média da determinação da tetraciclina realizada em seis replicatas.

Tabela 6. Análise da estabilidade da oxiteraciclina em plasma, nas concentrações de 50 e 5.000 ng/mL conservadas à -20 °C (freezer)

Concentração esperada (ng/mL)	Concentração no tempo zero (ng/mL)*	Concentração após 90 dias (ng/mL)*	CV (%)
50	56,36	49,27	8,89
5.000	5625,51	4895,03	6,99

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.1.2. Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico da oxitetraciclina obtido da análise do *pool* de leite encontra-se ilustrado na Figura 8

Figura 8. Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (1 $\mu\text{g/mL}$) em leite.

6.1.3. Determinação de oxitetraciclina no leite de vacas em lactação submetidas aos tratamentos dérmico e intramuscular

As amostras de leite foram analisadas segundo o procedimento especificado no item 4.4.1.2. A concentração foi expressa em ng/mL .

6.1.4. Animais Submetidos ao tratamento intramuscular

A Tabela 7 apresenta os dados obtidos de concentrações de oxitetraciclina em amostras de leite, através da análise conforme procedimento 4.4.1.2.

Os momentos M0 a M35 correspondem aos tempos descritos no item 4.1.

Tabela 7. Concentração de oxitetraciclina em leite em diferentes tempos (0 – 408h) após tratamento intramuscular (Grupo 1)

Resíduo oxitetraciclina leite - Animais Grupo 1											
Período de Coleta	Animal 373	Animal 423	Animal 465	Animal 427	Animal 310	Animal 435	Animal 432	Animal 461	Média	Desv. Padrão	CV (%)
M0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
M1	2771,99	776,98	2062,41	2328,10	779,10	1884,22	1035,49	1298,85	1617,14	751,81	46,49
M2	3823,89	1099,05	2429,62	3114,70	1577,37	3167,56	1310,11	1653,86	2272,02	1007,90	44,36
M3	3569,87	1672,41	2648,44	2888,82	1938,42	2496,83	2322,50	2188,06	2465,67	590,10	23,93
M4	2257,78	1077,71	2066,15	2736,18	1190,24	1714,52	2488,08	3158,94	2086,20	729,24	34,96
M5	901,57	616,32	1481,80	262,67	500,00	610,03	1171,16	693,82	779,67	390,87	50,13
M6	208,69	205,95	505,67	62,93	120,40	285,24	0,00	71,78	182,58	160,33	87,81
M7	105,73	153,82	173,65	0,00	104,65	119,05	81,07	42,06	97,50	56,57	58,02
M8	2546,36	1504,58	2287,78	2015,60	2168,12	2303,18	1107,15	2515,16	2055,99	504,93	24,56
M9	2543,33	3173,33	3042,20	1701,32	1367,61	1776,14	1992,91	2935,05	2316,49	693,89	29,95
M10	2284,11	1831,15	2447,86	977,80	1332,70	1548,09	1790,79	4531,14	2092,96	1094,50	52,29
M11	1627,32	1119,09	1751,77	234,37	903,28	519,93	1375,03	582,31	1014,14	549,34	54,17
M12	538,50	364,26	537,52	58,60	536,80	461,52	477,16	392,74	420,89	160,77	38,20
M13	127,75	142,97	237,33	65,91	106,16	177,19	252,58	128,34	154,78	64,05	41,38
M14	3381,04	2338,27	1962,40	2047,22	2750,51	2169,24	1839,38	3838,20	2540,78	725,30	28,55
M15	4326,87	1762,23	3447,35	1996,92	1379,20	2714,18	1697,08	1622,64	2368,31	1042,67	44,03
M16	3705,46	2081,70	2561,36	1664,37	1573,90	1592,74	1428,94	1333,37	1992,73	798,26	40,06
M17	2003,28	1545,39	1398,14	531,69	972,64	1022,75	632,22	741,60	1105,97	506,43	45,79
M18	920,25	492,85	1236,49	271,32	391,17	701,78	531,90	687,29	654,13	309,37	47,30
M19	463,38	338,85	482,10	107,77	374,52	432,32	246,08	587,25	379,03	149,68	39,49
M20	394,09	202,14	381,08	83,92	284,39	368,33	235,33	502,14	306,43	131,65	42,96
M21	261,88	106,30	380,55	74,71	251,79	231,08	115,59	165,51	198,43	102,01	51,41
M22	68,68	75,10	359,84	71,27	176,92	146,39	97,13	481,69	184,63	154,19	83,51
M23	85,42	74,92	185,42	68,84	112,41	97,54	101,64	115,86	105,26	36,45	34,63
M24	104,71	67,28	258,30	127,40	0,00	0,00	65,48	69,29	88,08	80,72	91,64
M25	174,40	101,50	138,50	0,00	0,00	0,00	76,83	98,33	73,70	67,64	91,78
M26	65,30	72,21	104,81	0,00	0,00	0,00	90,59	89,37	52,79	45,30	85,83
M27	0,00	445,91	94,19	0,00	0,00	0,00	86,20	78,79	88,14	150,81	171,11
M28	0,00	412,60	110,71	0,00	0,00	0,00	77,36	66,45	83,39	140,03	167,93
M29	0,00	336,48	74,71	86,99	0,00	89,31	77,04	59,20	90,47	105,77	116,92
M30	0,00	97,53	71,27	81,33	0,00	0,00	73,12	51,75	46,88	40,80	87,04
M31	0,00	71,27	0,00	0,00	0,00	0,00	62,32	50,57	23,02	32,25	140,10
M32	0,00	55,13	0,00	0,00	0,00	80,82	51,64	0,00	23,45	33,46	142,71
M33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	101,07	0,00	0,00	12,63	35,73	282,84
M34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	66,96	0,00	0,00	8,37	23,67	282,84
M35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*(0) Abaixo do limite de quantificação

A Figura 9 ilustra as médias das concentrações do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular.

Figura 9. Médias das concentrações do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular.

As Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 ilustram, respectivamente, as concentrações do resíduo de oxitetraciclina em leite x tempo de análise após administração intramuscular nos animais identificados com os números 373, 423, 465, 427, 310, 435, 432, e 461.

Figura 10. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 373.

Figura 11. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 423.

Figura 12. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 465.

Figura 13. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 427.

Figura 14. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 310.

Figura 15. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 435.

Figura 16. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 432.

Figura 17. Concentração do resíduo de oxitetraciclina em leite em relação ao tempo de análise após administração intramuscular no animal 461

6.1.5. Animais submetidos ao tratamento tópico

Os animais tratados por via tópica, conforme procedimento descrito no item 4.2., apresentaram valores residuais inferiores ao limite de quantificação do método.

6.2. PLASMA

6.2.1. Método Analítico

6.2.1.1. Linearidade

A Figura 18 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de um *pool* de plasma com as seguintes concentrações de oxitetraciclina: 50; 500; 1.000; 2.000, 5.000 e 10.000 ng.mL⁻¹.

Figura 18. Representação gráfica da linearidade da oxitetraciclina (50-10.000 ng/mL) em plasma

6.2.1.2. Limite de Detecção

O limite de detecção do método para a oxitetraciclina em plasma é de 39 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 17,40%.

6.2.1.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método para a oxitetraciclina em plasma é de 50 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 8,31%.

6.2.1.4. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a oxitetraciclina em plasma são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperação da oxitetraciclina em plasma.

Concentração de oxitetraciclina em plasma (ng/mL)	Recuperação *%	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)	p (T-student)
50	72,48	0,27	4,67	0,256
5.000	91,56	8,73	3,32	0,224
10.000	95,66	10,73	2,38	0,216

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.2.1.5. Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra-ensaio e interensaio para as amostras de plasma adicionadas de oxitetraciclina são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Precisão intra e inter-dias para a determinação de oxitetraciclina em plasma.

Conc. de oxitetraciclina em plasma (ng/mL)	Precisão intra-ensaio*		Precisão inter-ensaio (3dias)*	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
50	9,46	0,46	12,74	0,66
5.000	5,98	14,41	5,65	13,69
10.000	0,70	3,03	3,63	15,74

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.2.1.6. Exatidão

A exatidão do método é representada pela tendenciosidade, através do cálculo da inexatidão (CHASIN et al, 1998) é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Porcentagem de inexatidão para a determinação de oxitetraciclina em plasma

Concentração de oxitetraciclina em plasma (ng/mL)	Inexatidão (%)*
50	8,56
5.000	9,15
10.000	-5,71

*Média dos valores das análises em seis replicatas

6.2.1.7. Estabilidade

Os resultados do estudo de estabilidade das amostras de oxitetraciclina nas concentrações 50 e 10.000 ng/mL após 90 dias em freezer , são apresentadas na Tabela 11. As concentrações obtidas se referem à média da determinação da tetraciclina realizadas em seis replicatas.

Tabela 11. Análise da estabilidade da oxitetraciclina em plasma, nas concentrações de 50 e 10.000 ng/mL conservadas à -20 °C (freezer)

Concentração esperada (ng/mL)	Concentração no tempo zero (ng/mL)*	Concentração após 90 dias (ng/mL)*	CV (%)
50	54,28	45,74	15,70
10.000	9.828,43	8.666,71	10,55

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.2.2. Perfil Cromatográfico da oxitetraciclina extraída de plasma

A Figura 19 ilustra o perfil cromatográfico obtido da análise do *pool* de plasma adicionado de oxitetraciclina.

Figura 19. Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (10.000 ng/mL) em plasma

6.2.3. Determinação de oxitetraciclina no plasma de vacas submetidas aos tratamentos dérmico e intramuscular

As amostras foram analisadas segundo o procedimento especificado no item 4.4.2. A concentração foi expressa em ng/mL.

6.2.4. Animais submetidos ao tratamento intramuscular

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos de concentrações de oxitetraciclina em amostras de plasma através da análise realizada conforme procedimento 4.2. As amostras M0 a M35 correspondem ao procedimento descrito no item 4.1.

Tabela 12. Concentração de oxitetraciclina no plasma em diferentes tempos (0 - 408 h) após tratamento intramuscular.

Resíduo oxitetraciclina plasma - Animais Grupo 1											
Período de Coleta	Animal 373	Animal 423	Animal 465	Animal 427	Animal 310	Animal 435	Animal 432	Animal 461	Média	Desv. Padrão	CV (%)
M0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
M1	5149,00	3599,00	4382,34	4332,34	3365,67	5190,67	3665,67	0,00	3710,59	1647,48	44,40
M2	4957,34	4440,67	4674,00	4340,67	3582,34	6482,34	3807,34	3815,67	4512,55	924,81	20,49
M3	4407,34	3282,34	3590,67	3424,00	3149,00	3499,00	4865,67	3607,34	3728,17	593,77	15,93
M4	3674,00	3115,67	2940,67	2840,67	2357,34	2824,00	3457,34	2399,00	2951,09	461,64	15,64
M5	2582,34	2515,67	1940,67	1657,34	1390,67	1807,34	2182,34	1707,34	1972,96	422,14	21,40
M6	2149,00	1815,67	982,34	815,67	482,34	1290,67	1124,00	1199,00	1232,34	533,91	43,32
M7	507,34	415,67	432,34	307,34	157,34	307,34	499,00	257,34	360,46	123,36	34,22
M8	5332,34	5399,00	4799,00	4440,67	3207,34	3407,34	3940,67	4465,67	4374,00	814,67	18,63
M9	4257,34	3790,67	4157,34	3365,67	2632,34	2674,00	3615,67	3999,00	3561,50	629,67	17,68
M10	2107,34	1815,67	1265,67	1382,34	1765,67	2399,00	3190,67	3807,34	2216,71	885,50	39,95
M11	1332,34	1065,67	815,67	940,67	1299,00	665,67	1515,67	1315,67	1118,80	294,26	26,30
M12	565,67	524,00	740,67	407,34	474,00	165,67	865,67	782,34	565,67	227,65	40,24
M13	149,00	315,67	532,34	299,00	207,34	74,00	232,34	99,00	238,59	147,11	61,66
M14	4507,34	4624,00	5065,67	4215,67	3890,67	3490,67	4599,00	3807,34	4275,05	519,76	12,16
M15	3907,34	3249,00	4015,67	3657,34	3124,00	4774,00	3565,67	3599,00	3736,50	514,18	13,76
M16	3249,00	2990,67	3040,67	3132,34	2599,00	2449,00	3149,00	3099,00	2963,59	284,62	9,60
M17	2782,34	2715,67	3099,00	2874,00	2374,00	2140,67	2990,67	2982,34	2744,84	330,31	12,03
M18	2582,34	2565,67	2757,34	2674,00	2207,34	2232,34	2665,67	2824,00	2563,59	228,34	8,91
M19	465,67	449,00	582,34	557,34	99,00	899,00	557,34	715,67	540,67	230,04	42,55
M20	357,34	390,67	507,34	415,67	81,30	336,50	399,00	565,67	381,69	143,45	37,58
M21	349,00	374,00	465,27	374,00	0,00	67,75	390,67	549,00	321,21	189,45	58,98
M22	307,34	324,00	432,34	365,67	0,00	0,00	565,67	365,67	295,09	198,98	67,43
M23	232,34	307,34	399,00	424,00	0,00	0,00	507,34	382,34	281,54	191,56	68,04
M24	182,34	232,34	332,34	349,00	0,00	0,00	449,00	374,00	239,88	169,30	70,58
M25	140,67	215,67	307,34	340,67	0,00	0,00	315,67	349,00	208,63	146,42	70,18
M26	0,00	149,00	232,34	432,34	0,00	0,00	332,34	365,67	188,96	177,93	94,16
M27	0,00	84,42	182,34	307,34	0,00	0,00	190,67	332,34	137,14	136,89	99,82
M28	0,00	0,00	274,00	224,00	0,00	0,00	76,09	299,00	109,14	133,72	122,52
M29	0,00	0,00	207,34	94,84	0,00	0,00	0,00	282,34	73,06	112,75	154,32
M30	0,00	0,00	128,17	0,00	0,00	0,00	0,00	182,34	38,81	73,31	188,88
M31	0,00	0,00	107,34	0,00	0,00	0,00	0,00	66,71	21,76	41,72	191,77
M32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*(0) Abaixo do limite de quantificação

A Figura 20 ilustra a média das concentrações de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular.

Figura 20. Média das concentrações de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular

As Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, e 28 ilustram, respectivamente, as concentrações de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular nos animais 423, 427, 310, 435, 465, 432, 461, e 373.

Figura 21. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 423

Figura 22. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 427

Figura 23. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 310

Figura 24. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 435

Figura 25. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 465

Figura 26. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 432

Figura 27. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 461

Figura 28. Concentração de oxitetraciclina em plasma x tempo de análise após administração intramuscular do animal 373

6.2.5. Animais submetidos ao tratamento tópico

Os resultados obtidos das concentrações residuais de oxitetraciclina em amostras de plasma através da análise realizada conforme procedimento descrito no item 4.4.2. foram inferiores ao limite de quantificação do método utilizado.

6.3. LÍQUIDO SINOVIAL

6.3.1. Método Analítico

6.3.1.1. Linearidade

A Figura 29 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de um *pool* de líquido sinovial com as seguintes concentrações de oxitetraciclina: 50; 500; 1.000, 2.000 e 5.000 ng/mL.

Figura 29. Representação gráfica da linearidade da oxitetraciclina (50-5.000ng/mL) em líquido sinovial.

6.3.1.2. Limite de Detecção

O limite de detecção do método para a oxitetraciclina em líquido sinovial é de 40 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 19,72%.

6.3.1.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método para a oxitetraciclina em líquido sinovial é de 50 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 9,36%.

6.3.1.4. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a oxitetraciclina em líquido sinovial são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Recuperação da tetraciclina em líquido sinovial

Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial (ng/mL)	Recuperação *%	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)	p (T-student)
50	91,64	5,73	12,50	0,111
1.000	97,01	15,10	1,51	0,218
5.000	95,66	192,16	3,93	0,370

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.3.1.5. Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para as amostras de líquido sinovial adicionadas de oxitetraciclina são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14. Precisão intra e inter-ensaio para a determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial.

Conc. de oxitetraciclina em líquido sinovial (ng/mL)	Precisão intra-ensaio*		Precisão interensaio (3dias)*	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
50	9,64	0,28	13,31	0,40
1.000	3,00	1,79	5,63	3,43
5.000	8,37	25,05	9,58	28,46

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.3.1.6. Exatidão

A exatidão do método, representada pela tendenciosidade, através do cálculo da inexatidão (CHASIN et al, 1998) é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15. Porcentagem de inexactidão para a determinação de oxitetraciclina em líquido sinovial

Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial (ng/ml)	Inexactidão (%)*
50	-9,56
1.000	0,88
5.000	-1,15

*Média dos valores das análises em seis replicatas

6.3.1.7. Estabilidade

Os resultados do estudo de estabilidade das amostras de oxitetraciclina em líquido sinovial nas concentrações 50 e 5.000 µg/mL após 90 dias em freezer , são apresentadas na Tabela 16. As concentrações obtidas se referem a média da determinação da oxitetraciclina realizadas em sextuplicatas.

Tabela 16. Análise da estabilidade da oxitetraciclina em líquido sinovial, nas concentrações de 50 e 5.000 ng/mL conservadas à -20 °C (freezer).

Concentração esperada (ng/mL)	Concentração no tempo zero (ng/mL)*	Concentração após 90 dias (ng/mL)*	CV (%)
50	45,22	38,56	7,95
5.000	4.942,49	3.772,34	13,43

* Média dos valores das análises em seis replicatas

6.3.2. Perfil Cromatográfico da oxitetraciclina extraída de líquido sinovial

O perfil cromatográfico da oxitetraciclina obtido da análise do *pool* de líquido sinovial adicionados encontra-se ilustrado na Figura 30.

Figura 30. Perfil cromatográfico da oxitetraciclina (1.000 ng/mL) em líquido sinovial.

6.3.3. Determinação de oxitetraciclina no líquido sinovial de vacas em lactação submetidos aos tratamentos dérmico e intramuscular

As amostras foram analisadas segundo o procedimento especificado no item 4.4.3. A concentração foi expressa em ng/mL.

6.3.4. Animais submetidos ao tratamento intramuscular

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos de concentrações de oxitetraciclina em amostras de líquido sinovial através da análise conforme

Tabela 17. Concentração de oxitetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0 - 408 h) após tratamento intramuscular.

Período de Coleta	Animal 373	Animal 423	Animal 465	Animal 427	Animal 310	Animal 435	Animal 432	Animal 461	Média	Desv. Padrão	CV (%)
M0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
M1	1.967,06	2.568,83	2.023,11	599,00	2.105,70	2.126,35	2.551,13	1.869,71	1.976,36	613,12	31,02
M2	1.996,56	1.725,17	1.256,14	1.807,77	1.270,89	1.669,12	2.040,81	1.984,76	1.718,90	310,91	18,09
M3	1.267,94	1.374,14	1.365,29	1.005,41	834,32	1.533,43	1.854,96	984,76	1.277,53	332,15	26,00
M4	875,61	846,12	1.076,20	981,81	701,57	896,26	1.456,73	710,42	943,09	242,51	25,71
M5	710,42	695,67	846,12	443,00	651,42	754,67	866,76	616,03	698,01	135,07	19,35
M6	117,50	200,10	318,09	220,75	158,80	0,00	380,04	0,00	174,41	136,31	78,15
M7	0,00	0,00	149,95	55,55	0,00	0,00	226,65	0,00	54,02	87,50	161,98
M8	1.952,31	2.123,40	2.220,75	2.315,14	1.943,46	1.344,64	1.253,19	1.565,88	1.839,85	403,42	21,93
M9	2.453,78	1.412,49	1.728,12	1.928,71	1.194,20	760,57	1.079,15	1.214,85	1.471,48	540,55	36,74
M10	1.554,08	984,76	1.208,95	1.341,69	854,96	663,22	863,81	1.026,06	1.062,19	290,41	27,34
M11	1.495,08	657,32	1.046,71	1.200,10	725,17	530,48	1.011,31	778,27	930,55	318,80	34,26
M12	1.388,89	512,78	854,96	748,77	639,63	559,98	781,22	607,18	761,68	278,78	36,60
M13	978,86	0,00	191,25	93,90	200,10	0,00	0,00	0,00	183,01	332,88	181,89
M14	2.604,23	1.424,29	1.999,51	2.400,69	2.076,20	1.731,07	2.707,47	1.819,57	2.095,38	446,50	21,31
M15	1.430,19	1.096,85	1.557,03	1.745,82	1.315,14	1.282,69	967,06	1.568,83	1.370,45	258,28	18,85
M16	1.011,31	790,07	1.111,60	1.135,20	1.017,21	1.002,46	763,52	1.200,10	1.003,93	156,33	15,57
M17	781,22	621,93	875,61	993,61	846,12	822,52	554,08	872,66	795,97	143,19	17,99
M18	707,47	592,43	660,27	695,67	613,08	598,33	456,73	551,13	609,39	81,74	13,41
M19	262,04	93,90	67,35	0,00	155,85	147,00	0,00	0,00	90,77	94,12	103,69
M20	0,00	73,25	0,00	73,25	138,15	123,40	82,10	161,75	81,49	59,55	73,08
M21	138,15	55,55	0,00	0,00	542,28	88,00	79,15	397,74	162,61	198,89	122,31
M22	0,00	0,00	0,00	0,00	102,75	58,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M23	0,00	0,00	0,00	0,00	105,70	500,98	135,20	0,00	92,74	173,88	187,50
M24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	332,84	90,95	120,45	68,03	117,44	172,62
M25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	123,40	88,00	0,00	49,84	0,00
M26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	76,20	0,00	26,94	0,00
M27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	55,55	0,00	19,64	0,00
M28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M29	0,00	0,00	0,00	0,00	58,50	0,00	0,00	0,00	0,00	20,68	0,00
M30	0,00	0,00	0,00	0,00	70,30	0,00	0,00	0,00	0,00	24,86	0,00
M31	0,00	0,00	0,00	0,00	82,10	144,05	0,00	0,00	0,00	54,90	0,00
M32	0,00	0,00	0,00	0,00	70,30	0,00	0,00	0,00	0,00	24,86	0,00
M33	0,00	0,00	0,00	0,00	73,25	0,00	0,00	0,00	0,00	25,90	0,00
M34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
M35	0,00	0,00	0,00	0,00	85,05	0,00	0,00	0,00	0,00	30,07	0,00

* (0) Abaixo do limite de quantificação

A Figura 31 ilustra a média das concentrações de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular

Figura 31. Média das concentrações de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular.

As Figura 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39 ilustram, respectivamente as concentrações de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular nos animais 432, 423, 465, 435, 427, 461, 310, e 373.

Figura 32. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 432

Figura 33. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 423

Figura 34. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 465.

Figura 35. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 435

Figura 36. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 427

Figura 37. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 461.

Figura 38. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 310

Figura 39. Concentração de oxitetraciclina em líquido sinovial x tempo de análise após administração intramuscular no Animal 373

6.3.5. Animais submetidos ao tratamento tópico

Os resultados obtidos de concentrações de oxitetraciclina em amostras de líquido sinovial através da análise realizada conforme procedimento descrito em 4.4.3. são inferiores ao limite de quantificação do método.

7. DISCUSSÃO

Através dos resultados apresentados neste trabalho, diversas considerações poderiam ser tecidas sobre abordagens distintas, entretanto, do ponto de vista toxicológico são relevantes apenas os dados gerados da análise do leite, os quais expressam os valores residuais do antibiótico oxitetraciclina em diferentes tempos. Estes dados permitem estimar o período de carência para consumo humano nas duas formas de administração.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet preconiza como limite máximo de resíduos (LMR) a quantidade de 100 ppb para as tetraciclinas em leite (BRASIL, 2008).

O tratamento de múltiplas doses sugerido e utilizado neste estudo visa manter as concentrações séricas constantes durante o período de tratamento a fim de proporcionar maior eficácia no tratamento dos animais, bem como manter uma concentração constante do ativo no tecido lesado. Todavia, observando as Figuras 9, 20 e 31 correspondentes a média dos teores de oxitetraciclina nos animais tratados por via intramuscular em leite, plasma e líquido sinovial, respectivamente, verifica-se que o tempo de administração das doses não foi suficiente para a manutenção da máxima concentração de inibição bacteriana (MIC), aproximando-se da concentração zero. Desta forma, sugere-se a redução do tempo entre a administração das doses.

Por via tópica, não foram observados teores residuais em leite do antibiótico avaliado, segundo metodologia analítica utilizada, o que assegura o consumo

deste alimento após este tratamento sem que haja necessidade da observância do período de carência na utilização do antibiótico por esta via.

Observou-se experimentalmente que a composição da fase móvel foi de extrema importância para a obtenção do perfil cromatográfico das tetraciclina, e, assim como preconizado por Pena et al (1997), os melhores resultados foram obtidos em pH 2 tanto com o tampão oxalato, quanto o citrato ou o fosfato.

Os resultados obtidos na análise das figuras de mérito de validação dos métodos analíticos utilizados, com suas respectivas condições cromatográficas, permitem assegurar resultados confiáveis para as diferentes matrizes biológicas estudadas neste trabalho.

De acordo com os valores recomendados para a validação da metodologia analítica pela ANVISA, pela resolução 899, o estudo da linearidade, das três matrizes biológicas avaliadas neste estudo geraram retas com coeficiente de determinação superiores a 0,99. Todos os resultados dos parâmetros de validação obtidos estão em conformidade com a norma nacional vigente para a validação de métodos analíticos.

Nas análises das amostras de plasma, o método apresentou linearidade entre 50 ng/mL a 10.000 ng/mL. Os limites de detecção e de quantificação do método foram 39 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente. A precisão do método mostrou valores de coeficiente de variação inferiores a 10% e 1%, para as menores e maiores concentrações, respectivamente. Foram obtidas recuperação de 95,66% e exatidão de 90,85%.

Com relação às amostras de líquido sinovial, o método apresentou linearidade entre 50 ng/mL a 5.000 ng/mL. Os limites de detecção e de quantificação do método foram 40 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente. A precisão mostrou valores de coeficiente de variação inferiores a 10% e 6%, para as menores e maiores concentrações, respectivamente. Foram obtidas recuperação de 98,88 e exatidão de 99,12%.

Um dado que chama atenção é a diferença dos valores dos coeficientes de variação entre os animais do mesmo grupo. Este fato pode estar associado às variações individuais tais como, peso, produção e qualidade do leite, peso corpóreo, e idade. As variações foram mais acentuadas ao término de cada período e sucessiva reaplicação do medicamento. Isto ocorreu em virtude de alguns animais apresentarem valores abaixo ou próximo do limite de detecção do método, ao passo que outros animais apresentavam valores residuais consideráveis.

Através da administração do medicamento por via intramuscular, foram observados resíduos acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira (100 ppb) de oxitetraciclina no leite até 120 horas, ou seja, 5 dias após a última administração do medicamento pelo esquema seriado de doses. Já pela via tópica, não foram observados valores residuais na matriz biológica. Deve-se analisar a eficácia deste tratamento para verificar se há uma vantagem econômica aos produtores de leite e indústria alimentícia, uma vez que poderiam ser evitados prejuízos decorrentes de possíveis interferências do referido antibiótico no processo de produção de derivados, além de não ter de aguardar o período de carência para a comercialização deste alimento.

Além do leite, os animais tratados com o medicamento pela via tópica, apresentaram concentrações de oxitetraciclina inferiores aos limites de quantificação, tanto no plasma quanto no líquido sinovial, o que sugeriu uma eficácia questionável desta via de administração, conduzindo à hipótese que a via dérmica seria adequada como terapia adjuvante ao tratamento, em caso de lesões mais profundas das articulações dos bovinos. Entretanto, a avaliação do médico-veterinário evidenciou que o tratamento tópico foi altamente eficiente nos animais, levando a cura das lesões. Com relação ao tratamento IM, não foram observados resultados satisfatórios por esta via de administração, uma vez que a maior parte das lesões não regrediram após as administrações do antibiótico. Assim, conclui-se que o tratamento IM com a oxitetraciclina de longa ação foi ineficaz no tratamento da dermatite digital dos animais estudados, sendo o oposto observado com o tratamento tópico.

Do ponto de vista clínico, a possível eficácia após o tratamento tópico ocorreu em virtude do impedimento de novos microorganismos oriundos do ambiente no local da lesão, além de contar com o sistema imunológico dos animais para promover o controle e/ou cura da infecção.

Ainda, segundo a visão do veterinário, a administração IM de oxitetraciclina de longa duração foi insuficiente para promover uma concentração local na pele de oxitetraciclina nos animais avaliados para matar as bactérias causadoras da enfermidade, uma vez que a dermatite digital papilomatosa constitui-se de uma patologia que acomete a epiderme e a derme do dígito. Ao passo que o tratamento tópico propicia elevada concentração contínua de

oxitetraciclina nestes tecidos, sendo mais eficaz no controle bacteriano no local da lesão desta patologia num curto intervalo de tempo.

8. CONCLUSÕES

√ Os métodos analíticos validados para a determinação de oxitetraciclina em leite, plasma e líquido sinovial utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV após desproteinização ácida, apresentaram linearidade, limite de detecção, quantificação, exatidão, precisão e recuperação adequados à sua quantificação nas matrizes biológicas estudadas;

√ A administração do medicamento por via tópica apresentou teores de oxitetraciclina inferiores ao limite de quantificação nas matrizes biológicas objeto de estudo neste trabalho;

√ As amostras de leite provenientes de animais tratados pela via intramuscular apresentam valores residuais até 120 horas (5 dias) de oxitetraciclina, que corresponde ao período compreendido desde a última aplicação do medicamento, acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira (100 ppb);

√ Os elevados valores de coeficiente de variação encontrados entre os animais, poderiam estar associados às variações individuais tais como, peso, produção e qualidade do leite, peso corpóreo e idade dos animais;

√ Os dados supracitados sugeriram que o tratamento tópico corresponderia a uma terapia coadjuvante ao tratamento intramuscular no controle da infecção podal, entretanto, a terapia dérmica foi altamente eficiente nos animais, levando a cura das lesões;

√ A possível eficácia do tratamento dérmico pode estar associada ao impedimento da instalação de novos microorganismos no local da lesão em virtude da provável concentração contínua elevada de oxitetraciclina na derme e epiderme dos animais, correspondendo aos principais tecidos acometidos pela dermatite digital papilomatosa;

√ O tratamento intra-muscular não foi eficaz nos animais estudados, segundo o desenho experimental deste trabalho, uma vez que a grande maioria das lesões não regrediram após as administrações do antibiótico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERTHUM, F. Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.87-92.

ALTHAUS, R.L.; TORRES, A.; MONTERO, A.; BALASCH, S. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by devoltest photometric measurements. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.2, p.457-463, 2003.

ANDERSON, D.E.; ST-JEAN, G.; MORIN, D.E.; DUCHARME, N.G.; NELSON, D.R.; DESROCHERS, A. Traumatic flexor tendon injuries in 27 cattle. **Veterinary Surgery**, v.25, p.23-26, 1996.

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, n.1/2, p.23-32, 2005. [Review].

ARGÁEZ-RODRIGUEZ, F.J.; HIRD, D.W.; HERNÁNDEZ DE ANDA, J.; READ, D.H.; RODRÍGUEZ-LAINZ, A. Paillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, México: incidence and effect on reproduction and milk production. **Preventive Veterinary Medicine**, v.32, n.3/4, p.275-286, 1997.

BAGGOT, D.G.; RUSSEL, A.M. Lameness in cattle. **British Veterinary Journal**, v.137, n.1, p.113-132, 1980.

BARKER, S.A.; WALKER, C.C. Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods. **Journal of Chromatography**, v.624, n.1/2, p.195-209, 1992.

BERRY, L.S. Disease of the digital soft tissues. **Veterinary Clinics of North America**, v.17, p.129-142, 2001.

Banque de Données Automatisée sur les Medicaments. Disponível em: <http://www.biam2.org/www/sub177.html>. Acesso em: 05 jan. 2006.

BIOSHOP, J.R.; WHITE, C.H. Antibiotic residue detection in milk: a review. **Journal of Food Protection**, v.47, n.8, p.647-652, 1984.

BERMUDEZ, J. et al. Enfermedades podales de los ruminantes. Montevideo, Hemisério Sur, 0.19-37, 1992

BERTONE, AL.; McILWRAITH, C.W.; JONES, R.L.; NORRDIN, R.W.; RADIN, M.J.; LEBEL, J.L. Comparison of various treatments for experimentally induced equine infectious arthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, n.3, p.519-529, 1987.

BRASIL. Portaria n.72, de 3 de junho de 1998. O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária estabelece o programa de Controle e Resíduos Biológicos em Leite – PCRBL. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.107, 8 jun. 1998. Secção I, p.131.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões. Resíduos. Histórico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/relatorio_02_03.pdf. Acesso em: 20 jan 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação em Vigilância Sanitária. Resolução 899. Disponível em: [http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132\[655-2-0\].htm](http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132[655-2-0].htm). Acesso em: 14 jan. 2008b.

BRITT, J.S.; CARSON, M.C.; VON BREDOW, J.D.; CONDON, R.J. Antibiotic residues in milk samples obtained from cows after treatment for papillomatous digital dermatitis. **J Am Vet Med Assoc.** v.215, p.833-836, 1999.

BRODERSEN, D.E.; CLEMONS Jr, W.M.; CARTER, A.P.; MORGAN-WARREN, R.J.; WIMBERLY, B.T.; RAMAKRISHNAN, V. The structural basis for the action of the antibiotics Tetracycline, Pactamycin and Hygromycin B on the 30S Ribossomal Subunit. **Cell.** v.103, p.1143-1154, 2000.

BROWN, S.A., COOPOC, G.L., RIVIERE, J.E. Effects of dose and duration of therapy on gentamicin tissue residues in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. V.47, n.11, p.2373-2379, 1986.

BRITT, J.S.; CARSON, M.C.; VON BREDOW, J.D.; CONDON, R.J. Antibiotic residues in milk samples obtained from cows dermatitis after treatment for papillomatous digital dermatitis. **J Am Vet Med Assoc**. v.215, p.833-836, 1999.

BRITT, J.S.; GASKA, J.; GARRET, E.F. et al. Comparision of topical application of three products for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**. v.6, p.1134-1136, 1996.

BUTSON, R.J.; SCHRAMME, M.C.; GARLICK, M.H.; DAVIES, J.V. Treatment intrasynovial infection with gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads. **Veternary Record**, v.138, n.19, p.460-464, 1996.

CARLSSON, A.; BJÖRCK, L. Liquid chromatography verification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assays and the Charm II test. **Journal of Food Protection**, v.55, n.5, p.374-378, 1992.

CHAMBERS, H.F.; KAPUSNIK-UNER, J.; SANDLE, M.A. Antimicrobial agents: tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and, iscellaneous antibacterial agents. In: GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.47, p.1123-1153.

CHAMBERS, H.F.; SANDLE, M.A. Antimicrobial agents: general considerations. In: GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.43, p.1029-1056.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADOR, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.30, n.2, p.49-53, 1994.

CHELI, R.; MORTELLARO, C.M. La dermatite digitale del bovino. In: CONFERENCE ON DESEASE OF CATTLE, 8, 1974. **Proceedings**. S.l.: s.n., 1974. p.208-213.

CHERLET, M.; BAERE, S.D.; BACKER, P.D. Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.35, n.11, p.1342-1350, 2000.

CINQUINA, A.L.; LONGO, F.; ANASTASI, G, GIANNETTI, L.; COZZANI, R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal Chromatography, A**, n.987, n.1/2, p.227-233, 2003.

CLARKSON, M.J.; DOWNHAM, D.Y.; FAULL, W.B.; HUGHES, J.W.; MANSON, F.J.; MERRIT, J.B.; MURRAY, R.D.; RUSSEL, W.B.; SUTHERST, J.E.; WARD, W.R. Incidence and prevalence of lameness in dairy cattle. **Veterinary Record**, v.8, p.563-567, 1996.

COULON, J.B.; LESCOURRET, F.; FONTY, A. Effect of foot lesions on milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.44-49, 1996.

COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.422-433.

CROUBELS, S.; DE BAERE, S.; DE BACKER, P. Practical approach for stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage. **Analytica Chimica Acta**, v.483, n.1/2, p.419-427, 2003.

DENOBILO, M. **Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência.** São Paulo, 2002. 121p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

DESROCHERS, A.; ST-JEAN, G.; ANDERSON, D.E. Use of facilitated ankylosis in the treatment of septic arthritis of the distal interphalangeal joint in cattle: 12 cases (1987-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.206, n.12, p.1923-1927, 1995.

DIAS, R.S. Conceitos e aplicações práticas fundamentais para a Saúde do Casco http://www.nucleovet.com.br/materias_arquivos/01.doc Acesso em 19 jan 2008.

DÖPFER, D.; KOOPMANS, A.; MEIJER, F.A.; SZAKALL, I.; SCHUKKEN, Y.H.; KLEE, W.; BOSMA, R.B.; CORNELISSE, J.L.; VAN ASTEN, A.J.A.M.; TERHUUME, A.A.H.M. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. **Veterinary Record**, v.140, n.24, p.620-623, 1997.

ELMORE, R.G. Food-animal regional anesthesia. 7. Bovine blocks: intravenous limb block. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, v.75, n.12, p.1835-1836, 1980.

FAJT, V.R.; APLEY, M.D. Antimicrobial issues in bovine lameness. **Veterinary Clinics of North America**, v.17, p.159-174, 2001.

FEDENIUK, R.W.; SHAND, P.J. Theory and methodology of antibiotic extration from matrices. **Journal of Chromatography, A**, v.812, p.3-15, 1998.

FERGUSON, J.G. Surgery of distal limb. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D. **Lameness in Cattle**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. cap.16, p.248-261.

FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Eficácia da gentamicina e cloxamicina para tratamento intramamário de vacas secas. **Veterinarske Novice**, v.6, n.2, 2000.

FURUSAWA, N. Rapid liquid chromatography determination of oxytetracycline in milk. **Journal of Chromatography, A**, v.839, p.247-251, 1999.

GAGNON, H.; FERGUSON, J.G.; PAPICH, M.G.; BAILEY, J.V. Single-dose pharmacokinetics of cefazolin in bovine synovial fluid after intravenous regional injection. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.17, p.31-37, 1994.

GREENOUCH, P.R.; BROOM, D.M.; ESSLEMONT, R.J.; GALINDO, F.A. Basic concepts of bovine lameness. In: GREE GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.400-404.

GRUND, S.; NATTERMANN, H.; HORSSCH, F. Zum elektronenmikroskopischen Spirochäten-Nachweis bei der Dermatitis digitalis des Rindes. **Journal of Veterinary Medicine, B: Infectious diseases and Veterinary Public Health**, v.42, p.533-542, 1995.

GUARD, C. *apud* SHIRLEY, R. Trim your cost. **Dairy Herd Management**, v.Dez., p.16-7, 1997.

HADDAD, N.S.; RAVIS, W.R.; PEDERSOLI, W.M.; CARSON Jr., R.L. Pharmacokinetics of single doses of gentamicin given by intravenous and

intramuscular routes to lacting cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.4, p.808-813, 1986a.

HADDAD, N.S.; PEDERSOLI, W.M.; CARSON Jr., R.L.; RAVIS, W.R. Concentration of gentamicin in serum, milk, urine, endometrium and skeletal muscle of cows after repeated intrauterine injections. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1597-1601, 1986b.

HAUCK-BAUER, R. Untersuchungen über den therapeutischen Nutzens regionalen intravenösen Verabreichungen von Oxytetracyclin in die Vv. Digit. Dors. Comm. III et IV bei Klauenerkrankungen des Rindes. **Vet Med. Diss.**, 1977.

HERNANDEZ, J.; SHEARER, J.K. Efficacy of oxytetracycline for treatment of papillomatous digital dermatitis lesions on various anatomic locations in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.216, p.1288-1290, 2000.

HERNANDEZ, J.; SHEARER, J.K.; ELLIOTT, J.B. Comparison of topical application of oxytetracycline and four nonantibiotic solutions for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, p.688-690, 1999.

HIRSBRUNNER, G.; STEINER, A. Treatment of infectious arthritis of the radiocarpal joint of cattle with gentamicin-impregnated collagen sponges. **Veterinary Record**, v.142, n.15, p.399-402, 1998.

HONNAS, C.M.; SCHUMAKER, J. KUESIS, B.S. Ankylosis of the distal interphalangeal joint in a horse after septic arthritis and septic navicular bursitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.7, p.964-968, 1992.

HONNAS, C.M.; SCHUMACHER, J.; COHEN, N.D.; WATKINS, J.P.; TAYLOR, T.S. Septic tenosynovitis in horse: 25 cases (1983-1989). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.199, n.11, p.1616-1622, 1991.

KASARI, T.R.; MARQUIS, H.; SCANLAN, C.M. Septic arthritis and osteomyelitis in a bovine digit: a mixed infection of *Actinomyces pyogenes* and *Fusobacterium necrophorum*. **Cornell Veterinarian**, v.78, n.3, p.215-219, 1988.

KOFLER, J. Dermatitis digitalis ("Mortello disease") in einem Milchviehbestand in Niederösterreich. Wein **Tierärztl Mschr.** v.84, p.254-265, 1997.

KOFLER, J. Septic arthritis of the pastern in cattle-clinical, radiological and sonographic findings and treatment. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.108, n.8, p.281-289, 1995.

KOWALSKI, C.; POMORSKA, M.; SLAWIK, T. Development o HPLC with UV-VIS detection for the determination of the level of oxytetracycline in the biological matrix. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.29, n.18, p.2721-2731, 2006.

KURZAWA, M.; KOWALCZYK-MARZEC, A. Eletrochemical determination of oxytetracycline in veterinary drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, n.1, p.95-102, 2004.

LAVEN, R.A.; PROVEN, M.J. Use of an antibiotic footbath in the treatment of bovine digital dermatitis. **Veternary Record**, v.28, p.503-506, 2000.

LLOYD, K.C.; STOVER, S.M.; PASCOE, J.R.; POOL, R.R.; KURPERSHOEK, C. Effect of gentamicin sulfate and sodium bicarbonate on the synovium clinically normal equine antebrachiocarpal joints. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.5, p.650-657, 1988.

LLOYD, K.C.; STOVER, S.M.; PASCOE, J.R.; ADAMS, P. Synovial fluid pH, cytologic characteristics, and gentamicin concentration after intra-articular adminstration of the drug in an experimental model of infectious

arthritis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.1363-1369, 1990.

LYKKEBERG, A.K.; HALLING-SORENSEN, B.; CORNETT, C.; TJORNELUND, J.; HONORE HANSENS, S. Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS., v.34, n.2, p.325-332, 2004
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

MEIJER, L.A.; CEYSSENS, K.G.F.; GRÈVE, B.I.J.A.C.; BRUIJN, W. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. **Veterinary Quarterly**, v.15, n.1, p.1-5, 1993.

MEVIUS, D.J.; NOUWS, J.F.; BREUKINK, H.J.; VREE, T.B.; DRIESSENS, F.; VERKAIK, R. Comparative pharmacokinetics, bioavailability and renal clearance of five parenteral oxytetracycline 20% formulations in dairy cows. **Veterinary Quarterly**, v.8, p.285-294, 1998.

MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of Food Protection**, v.61, n.6, p.742-756, 1998.

MORCK, D.W.; OLSON, M.E.; LOUIE, T.J.; KOPPE, A.; QUINN, B. Comparison of ceftiofur sodium and oxitetracycline for treatment of acute

interdigital phlegmon (foot rot) in feedlot cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.212, n.2, p.254-257, 1998.

NAVARRE, C.B.; ZHANG, L.; SUNKARA, G.; DURAN, S.H.; KOMPELLA, U.B. Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics**, v.22, n.1, p.13-19, 1999.

NOUWS, J.F.; BREUKINK, H.J.; BINKHORST, G.J.; LOHUIS, J.; VAN LITH, P.; MEVIUS, D.J.; VREE, T B. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of eight parenteral oxytetracycline 10% formulations in dairy cows. **Veterinary Quarterly** v.7, n.4, p.306-314, 1985.

NUSS, K.; WEAVER, M.P. Resection of the distal interphalangeal joint in cattle: an alternative to amputation. **Veterinary Record**, v.128, n.23, p.540-543, 1991.

OHYA, T.; YAMAGUCHI, H.; NII, Y.; ITO, H. Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. **Veterinary Record**, v.145, n.11, p.316-318, 1999.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography, A**, v.882, n.1/2, p.109-133, 2000. [Review].

ORSINI, J.A. Strategies for treatment of bone and joint infections in large animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, n.10, p.1190-1193, 1984.

PALERMO-NETO, J. Resíduos de antimicrobianos em alimentos. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.7, n.22, p.65-71, 2001.

PEDERSOLI, W.M.; JACKSON, J.; FROBISH, R.A. Depletion of gentamicin in the milk of Holstein cows after single and repeated intramammary and parenteral treatments. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.18, n.6, p.457-463, 1995.

PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclinas: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.67, n.4, p.149-154, 1997.

PENA, A.L.S.; SILVEIRA, M.I.N.; CASTILLO, B. Antibióticos em alimentos: determinação e quantificação por HPLC com detecção fluorimétrica. **Ars Pharmaceutica**, v.38, n.1, p.27-37, 1997b.

REBHUN W.C. 2000. Doenças do Gado Leiteiro. Editora Roca, São Paulo.140p.

RODRIGUEZ-LAINZ, A.; HIRD, D.W.; CARPENTER, T.E.; READ, D.H. Case-control study of papillomatous digital dermatitis in southern California dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v.28, n.2, p.117-131, 1996a.

RODRIGUEZ-LAINZ, A.; HIRD, D.W.; WALKER, R.L. et al. Papillomatous digital dermatitis in 458 dairies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.209, p.1464-1467, 1996b.

RODRIGUEZ-LAINZ, MELENDEZ-RETAMAL, P.; HIRD, D.W.; READ, D.H.; WALKER, R.L. Farm-and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis in Chilean dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.42, n.2, p.87-97, 1999.

RODRIGUEZ-LAINZ, MELENDEZ-RETAMAL, P.; HIRD, D.W.; READ, D.H. Papillomatous digital dermatitis in Chilean dairies and evaluation of a screening method. **Preventive Veterinary Medicine**, v.37, n.1/4, p.197-207, 1998.

RULE, R.; MORENO, L.; SERRANO, J.M.; ROMAN, A.G.; MOYANO, R.; GARCIA, J. Pharmacokinetics and residues in milk of oxytetracyclines administered parentally to dairy goats. **Austalian Veterinary Journal**, v.79, n.7, p.492-496, 2001.

SADICK, N.S. Antibiotics: unapproved uses or indications. **Clinics in Dermatology**, v.18, p.11-16, 2000.

SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **Journal of Chromatography, A**, v.812, p.99-109, 1998.

SILVA, P. Farmacologia. Lincomicidas, Tetraciclina e Cloranfenicol. 6ª. Ed. Guanabara Koogan Cap. 104, p.1051-1054.

SILVA JR.; RATH, S.; REYES, F.G.R. Determinação de tetraciclina em medicamentos veterinários utilizando análise por injeção em fluxo (FIA). **Rev. Bras. Tox**, 17 (2), 19-24, 2004.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.3, p.487-493, 2002.

SPINOSA, H.S. Antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e análogos In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006a. p. 477-481.

SPINOSA, H.S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à**

medicina veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006b. p. 433-439.

STANEK, C. Basis of the intravenous regional antibiotics in digital surgery in cattle. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.49, n.2, p.53-58, 1994.

STANEK, C. Septic arthritis of the hoof joint in the horse-diagnosis, radiologic changes and therapy. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v.139, n.13, p.134-143, 1997.

THURMON, J.C.; KO, J.C.H. Anesthesia and chemical restraint. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D.; WEAVER, A.D., eds. **Lameness in cattle**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. cap.4, p.41-55.

TIMONEY, J.F. The tetracyclines. In: STEELE, J.H.; JUKES, T.H.; DuPONT, H.L.; CRAWFORD, L.M., eds. **Antibiotics, sulfonamides and public health**. Boca Raton: CRC Press, 1984. v.1, p.267-279 (CRC Handbook Series in Zoonoses: Section D).

TORTORA, G.; FUNKE, B.R. CASE, C.L. Drogas antimicrobianas. In: TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p.531-552.

TRENT, A.M.; REDIC-KILL, K.A. Clinical pharmacology. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D.; WEAVER, A.D., eds. **Lameness in cattle**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. cap.5, p.56-70.

TROSTLE, S.S.; HENDRICKSON, D.A.; STONE, W.C.; KLOHNEN, A.A. Use of antimicrobial-impregnated polymethyl methacrylate beads for treatment of chronic, refractory septic arthritis and osteomyelitis of the digit in a Bull. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, n.3, p.404-407, 1996.

TYCZKOWSKA, K.L.; VOYKSNER, R.D.; ANDERSON, K.L.; ARONSON, A.L. Determination of ceftiofur and its metabolite desfuroylceftiofur in bovine serum and milk by ion-paired liquid chromatography. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.614, n.1, p.123-134, 1993.

WALKER, R.L.; READ, D.H.; LORETZ, K.J.; NORDHAUSEN, R.W. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. **Veterinary Microbiology**, v.47, n.3/4, p.343-355, 1995.

WALKER, R.L.; READ, D.H.; LORETZ, K.J.; HIRD, D.W.; BERRY, S.L. Humoral response of dairy cattle to spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.7, p.744-748, 1997.

WEAVER, A.D. Intravenous local anesthesia of the lower limb in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.160, n.1, p.55-57, 1972.

WELLS, S.J.; GARBER, L.P.; WAGNER, B.A. Papillomatous digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.38, p.11-24, 1999.

WHITAKER, D.A.; KELLY, J.M.; SMITH, E.J. Incidence of lameness in dairy cows. **Veterinary Record**, v.113, p.60-62, 1983.

YAO, J.D.C.; MOELLERING Jr.; R.C. Antibacterial agents. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. p.1281-1307.

YERUHAM, I.; PERL, S. Clinical aspects of an outbreak of papillomatous digital dermatitis in a dairy cattle herd. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.69, n.3, p.112-115, 1998.