UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Comparação entre as concentrações de tetraciclina no
plasma, líquido sinovial e leite de vacas com doença do
casco, submetidas às administrações intravenosa e
intravenosa regional e sua implicação na presença de
resíduos no leite

Cláudia Esteban

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Elizabeth de S. Nascimento

São Paulo
2003

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

E79c Esteban, Cláudia
Comparação entre as concentrações de tetraciclina no plasma, líquido sinovial e leite de vacas com doença do casco, submetidas às administrações intravenosa e intravenosa regional e sua implicação na presença de resíduos no leite / Cláudia Esteban. -- São Paulo, 2003.
76p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

1. Contaminação de alimentos : Toxicologia 2. Leite : Legislação I. T. II. Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.

615.954 CDD

Cláudia Esteban

Comparação entre as concentrações de tetraciclina no plasma,
líquido sinovial e leite de vacas com doença do casco, submetidas
às administrações intravenosa e intravenosa regional e sua
implicação na presença de resíduos no leite

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth de S. Nascimento
orientador/presidente

Profa. Dra. Helenice de S. Spinosa
1º. examinador

Dra. Myriam Clara Salvadori
2º. examinador

São Paulo, 26 de agosto de 2003.

Aos meus pais Juan e Elena por me impulsionarem a crescer.
Para Daniel, Elena e Maria Adela pela amizade e companheirismo.
Para Beatriz, Gabriela, Mikael e Rafael pela alegria que trouxeram à
minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Elizabeth Nascimento não apenas pela orientação científica mas pela infinita compreensão e preciosa amizade.

A todos os meus colegas do laboratório pela companhia agradável. Em especial ao Humberto, Michella, Maurício, Patrícia e Bismark pelo auxílio em diversos momentos no desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao Celso Rodrigues pelo fornecimento das amostras.

À Prof^a. Regina Lúcia por disponibilizar os recursos de seu laboratório.

Ao Prof. Antonio Flávio Mídio pelas significativas reflexões e discussões sobre Toxicologia.

E finalmente, agradeço sobretudo a Deus.

Resumo

ESTEBAN, C. Comparação entre as concentrações de tetraciclina no plasma, líquido sinovial e leite de vacas com doença de casco, submetidas à administração intravenosa e intravenosa regional e sua implicação na presença de resíduos no leite. São Paulo, 2003. Dissertação (mestrado). 76 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. cesteban@usp.br. Orientador: Elizabeth de Souza Nascimento.

Palavras-chave: tetraciclina, administração intravenosa, administração intravenosa regional, resíduos em leite, plasma, líquido sinovial.

O presente trabalho visa desenvolver métodos que permitam determinar as concentrações de tetraciclina, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, no plasma e líquido sinovial, além de analisar as concentrações correspondentes em leite de gado leiteiro em lactação submetidos aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional.

Desta forma, objetivando determinar a depuração da tetraciclina no organismo dos animais tratados, a concentração do fármaco 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 adequados à quantificação do antibiótico nas matrizes biológicas estudadas.

As amostras de leite de animais tratados com o medicamento por via intravenosa regional, não apresentaram resíduos após 120h da administração do fármaco. O mesmo ocorreu plasma e líquido sinovial após 48 h.

Através da administração via intravenosa do medicamento foram observados resíduos no leite em todos os tempos avaliados, ao passo que no plasma e líquido sinovial, a presença do princípio ativo não foi detectada após 72 horas pós-tratamento.

Abstract

ESTEBAN, C. Comparision among tetracycline concentrations in plasma, synovial fluid and milk in cows with lameness in foot, subjected to intravenous and regional intravenous administration and their implications in the presence of residues in milk. São Paulo, 2003. Dissertação (Mestrado). 76 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. cesteban@usp.br. Orientador: Elizabeth de Souza Nascimento.

Key-words: tetracycline, intravenous administration, regional intravenous administration, milk residues, serum, synovial fluid.

The purpose of the present work is to develop methods which allow the determination of tetracycline by High Pressure Liquid Chromatography in serum, synovial fluid, as well as analyze the corresponding milk concentrations in milk cows subjected to intravenous and regional intravenous treatment.

Therefore, aiming to determine the clearance of tetracycline in the body of the treated animals, the concentration of the active principle in the action site and the residual quantity in milk, biological matrices were collected at different times.

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

In relation to the milk samples from animals treated with the drug by regional intravenous via, they did not present residues of tetracycline after 120 h post-administration. The values were also null for both serum and synovial fluid after 48 h.

Through regional intravenous drug administration, milk residues were observed in all the evaluated times whereas for serum and synovial fluid, the presence of the active principle was not detected after 72h post-treatment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1. Agente anti-microbiano.....	03
2.2. Tetraciclinas.....	04
2.2.1. Farmacocinética.....	05
2.2.2. Farmacodinâmica.....	07
2.2.3. Efeitos adversos.....	09
2.2.4. Uso das tetraciclinas em medicina veterinária e a sua associação às infecções podais.....	10
2.2.5. Determinação de tetraciclinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	14
3. OBJETIVO.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Animais.....	18
4.2. Material.....	21
4.2.1. Reagentes.....	21
4.2.2. Equipamentos, acessórios e vidraria.....	21
4.3. Métodos.....	22
4.3.1. Método analítico para a determinação de tetraciclina em leite.....	22
4.3.1.1. Condições cromatográficas.....	23
4.3.1.2. Procedimento analítico.....	24
4.3.1.3. Parâmetro de validação.....	25
4.3.1.3.1. Linearidade.....	25
4.3.1.3.2. Curva de calibração.....	25
4.3.1.4. Determinação da tetraciclina em amostras de leite coletadas após as administrações por via intravenosa e intravenosa regional.....	25
4.3.2. Método analítico para a determinação de tetraciclina em plasma	26
4.3.2.1. Condições cromatográficas.....	26
4.3.2.2. Procedimento analítico.....	27

4.3.2.3. Validação do método.....	28
4.3.2.3.1. Limite de detecção.....	28
4.3.2.3.2. Limite de quantificação.....	29
4.3.2.3.3. Recuperação.....	29
4.3.2.3.4. Estudo de linearidade.....	30
4.3.2.3.5. Curva de calibração.....	30
4.3.2.3.6. Precisão.....	31
4.3.2.3.7. Exatidão.....	31
4.3.2.3.8 Estabilidade do analito na amostra.....	32
4.3.2.4. Análise das amostras de plasma coletadas após as administrações intravenosa e intravenosa regional.....	32
4.3.3. Método analítico para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial.....	32
4.3.3.1. Condições cromatográficas.....	32
4.3.3.2. Procedimento analítico.....	33
4.3.3.3. Validação do método.....	35
4.3.3.3.1. Limite de detecção.....	35
4.3.3.3.2. Limite de quantificação.....	35
4.3.3.3.3. Recuperação.....	35
4.3.3.3.4. Estudo de linearidade.....	36
4.3.3.3.5. Curva de calibração.....	36
4.3.3.3.6. Precisão.....	37
4.3.3.3.7. Exatidão.....	37
4.3.3.3.8 Estabilidade do analito na amostra.....	38
4.3.3.4. Análise das amostras de líquido sinovial coletadas após as administrações intravenosa e intravenosa regional.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Leite.....	39
5.1.1. Linearidade.....	39
5.1.2. Perfil cromatográfico.....	40
5.1.3. Determinação de tetraciclina no leite de vacas em lactação submetidas aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional.....	40
5.1.3.1. Animais submetidos ao tratamento intravenoso.....	40
5.1.3.2. Animais submetidos ao tratamento intravenoso regional.....	41

5.2. Plasma.....	43
5.2.1. Limite de detecção.....	43
5.2.2. Limite de quantificação.....	43
5.2.3. Recuperação.....	43
5.2.4. Estudo de linearidade.....	44
5.2.5. Precisão.....	44
5.2.6. Exatidão.....	45
5.2.7. Perfil cromatográfico.....	46
5.2.8. Estabilidade do analito na amostra.....	46
5.2.9. Determinação de tetraciclina no plasma de vacas submetidas aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional.....	47
5.2.9.1. Animais submetidos ao tratamento intravenoso.....	47
5.2.9.2. Animais submetidos ao tratamento intravenoso regional.....	48
5.3. Líquido sinovial	50
5.3.1. Limite de detecção.....	50
5.3.2. Limite de quantificação.....	50
5.3.3. Recuperação.....	50
5.3.4. Estudo de linearidade.....	51
5.3.5. Precisão.....	51
5.3.6. Exatidão.....	52
5.3.7. Perfil cromatográfico.....	53
5.3.8. Estabilidade do analito na amostra.....	53
5.3.9. Determinação de tetraciclina no líquido sinovial de vacas submetidas aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional.....	54
5.3.9.1. Animais submetidos ao tratamento intravenoso.....	54
5.3.9.2. Animais submetidos ao tratamento intravenoso regional.....	55
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	64
8. RECOMENDAÇÃO.....	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Gradiente da fase móvel usada na detecção da tetraciclina em leite.....	23
TABELA 2. Gradiente da fase móvel usada na detecção da tetraciclina em plasma	27
TABELA 3. Gradiente da fase móvel usada na detecção da tetraciclina em líquido sinovial.....	33
TABELA 4. Concentração de tetraciclina em leite em diferentes tempos (0 – 120 h) após o tratamento intravenoso.....	41
TABELA 5. Concentração de tetraciclina em leite em diferentes tempos (0 – 120 h) após o tratamento intravenoso regional.....	42
TABELA 6. Recuperação da tetraciclina em plasma.....	43
TABELA 7. Precisão intra e inter ensaios para a determinação de tetraciclina em plasma.....	45
TABELA 8. Porcentagem de inexatidão para a determinação de tetraciclina em plasma.....	45
TABELA 9. Análise da estabilidade da tetraciclina em plasma, nas concentrações de 50 e 13.000 ng/mL conservadas a –20 °C (freezer).....	46
TABELA 10. Concentração de tetraciclina no plasma em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso.....	47
TABELA 11. Concentração de tetraciclina no plasma em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso regional.....	48
TABELA 12. Recuperação da tetraciclina em líquido sinovial.....	50
TABELA 13. Precisão intra e inter ensaios para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial.....	52

TABELA 14. Porcentagem de inexatidão para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial.....	52
TABELA 15. Análise da estabilidade da tetraciclina em líquido sinovial, nas concentrações de 50 e 415.000 ng/mL conservadas a –20 °C (freezer)..	54
TABELA 16. Concentração de tetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso.....	55
TABELA 17. Concentração de tetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso regional.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fórmula estrutural da tetraciclina.....	05
FIGURA 2. Mecanismo de ação dos antibióticos na síntese protéica.....	08
FIGURA 3. Esquema do tratamento dos animais submetidos às administrações de cloridrato de tetraciclina por via intravenosa e intravenosa regional.....	20
FIGURA 4. Marcha analítica utilizada na determinação de tetraciclina em leite.....	24
FIGURA 5. Marcha analítica utilizada na determinação de tetraciclina em plasma.....	28
FIGURA 6. Marcha analítica utilizada na determinação de tetraciclina em líquido sinovial	34
FIGURA 7. Representação gráfica da linearidade da tetraciclina (50-15.000 ng/mL) em leite.....	39
FIGURA 8. Perfil cromatográfico da tetraciclina (2.700 ng/mL) em leite.....	40
FIGURA 9. Concentração do resíduo de tetraciclina em leite x tempo após administrações intravenosa e intravenosa regional.....	42
FIGURA 10. Representação gráfica da linearidade da tetraciclina (50 – 13.000 ng/mL) em plasma.....	44
FIGURA 11. Perfil cromatográfico da tetraciclina (5.000 ng/mL) em plasma.....	46
FIGURA 12. Concentração do resíduo de tetraciclina no plasma x tempo de colheita de amostras após administrações intravenosa e intravenosa regional.....	49

FIGURA 13. Representação gráfica da linearidade da tetraciclina em líquido sinovial. (A) 50-15.000 ng/mL. (B) 15 - 415 µg/mL.....	51
FIGURA 14. Perfil cromatográfico da tetraciclina (5.000 ng/mL) em líquido sinovial.....	53
FIGURA 15. Concentração do resíduo de tetraciclina no líquido sinovial x tempo de colheita das amostras após administrações intravenosa e intravenosa regional.....	56
FIGURA 16. Concentração de tetraciclina x tempo de colheita das amostras após administração intravenosa.....	57
FIGURA 17. Concentração de tetraciclina x tempo de colheita das amostras após administração intravenosa regional.....	57

1. INTRODUÇÃO

As afecções que induzem à claudicação constituem-se em um dos mais importantes problemas que acometem a espécie bovina, sendo superadas somente pelos distúrbios reprodutivos e pelas infecções na glândula mamária, implicando assim em prejuízos econômicos significativos ao agronegócio (BAGGOTT & RUSSELL, 1980; CLARKSON *et al.*, 1996; 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 pelos bovinos é originada de doenças podais nas quais podem haver a participação de microorganismos. As opções de tratamento para tais patologias 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, deve-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 que favorecem 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 terapia antimicrobiana acarreta a presença de resíduos em leite, os quais devem estar dentro dos limites máximos de resíduos (LMR – 100 ppb) para consumo humano, fazendo-se necessário o estabelecimento do período de carência.

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).

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver uma metodologia para determinação de concentração de tetraciclina no plasma, líquido sinovial e leite de bovinos tratados por via intravenosa e intravenosa regional, além de estabelecer o período de carência adequado à este tipo de tratamento visando que os limites máximos de resíduos em leite sejam compatíveis com as legislações vigentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Agente anti-microbiano

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. Os antibióticos e os quimioterápicos, por atuarem especificamente sobre os organismos causadores da patologia, são considerados como específicos (SPINOSA, 1999b).

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, 2001a).

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 as sintetizadas em laboratório correspondem aos quimioterápicos. Há ainda aquelas que são produzidas parcialmente por microorganismos e concluídas em laboratórios, sendo denominados antibióticos semi-sintéticos (ALTERTHUM, 1999).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com diversos critérios, tais como (SPINOSA, 1999b):

- estrutura química: derivados de aminoácidos, açúcares, entre outros;

- ação biológica: bactericida, bacteriostático, entre outros;
- espectro de ação: gram-negativos, gram-positivos, amplo espectro, entre outros;
- 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 (quinolonas, nitrofuranos, sulfas entre outros) e ao seu uso terapêutico (antivirais, antifúngicos, entre outros.) (SPINOSA, 1999b).

2.2 Tetraciclinas

As tetraciclinas foram descobertas a partir de triagens 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. A partir do conhecimento da estrutura química desses compostos, em 1952, foi sintetizada a tetraciclina. Outros compostos dessa família de estruturas químicas semelhantes foram sintetizados em laboratório, tais como a demeclociclina, metaciclina e a doxicilina, que não contêm o grupo característico CH_3 ligado ao anel (CHAMBERS, 2001b).

A Figura 1 ilustra a estrutura da tetraciclina

Figura 1. Fórmula estrutural da tetraciclina

2.2.1. Farmacocinética

Quando administrada por via oral, as tetraciclina são parcialmente absorvidas no trato gastrointestinal sendo que a presença de alimentos diminui sua absorção (SPINOSA, 1999a, TORTORA, 2000).

A maior parte da absorção ocorre no estômago e intestino delgado superior, sendo mais acentuada em jejum; a absorção 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 tetraciclina relaciona-se ao aumento do pH gástrico e a subsequente quelação (CHAMBERS, 2001b).

Após 2 horas da administração oral são alcançadas concentrações plasmáticas de 3 a 5 µg/mL, sendo que 1 hora após a administração intravenosa observam-se picos de concentrações de 10 a 20 µg/mL. A meia-vida plasmática em mamíferos hígidos situa-se na faixa de 7 a 19 horas dependendo da tetraciclina

analisada (SPINOSA, 1999a; TIMONEY, 1984; YAO & MOELLERING, 1995).

As tetraciclinas são amplamente distribuídas por todo o organismo, sendo que os seus volumes de distribuição são dependentes da lipossolubilidade do composto e da sua 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, 2001b).

Esses compostos são distribuídos e concentram-se no fígado e rins após a administração oral ou intravenosa (TIMONEY, 1996).

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

De acordo com YAO & MOELLERING (1995), esses antibióticos são biotransformados pelo fígado e excretados na bile, onde são parcialmente reabsorvidos. Observa-se no fígado uma concentração três a cinco vezes superiores àquelas encontradas no plasma.

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. 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 tetraciclina (CHAMBERS, 2001b).

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

2.2.2. Farmacodinâmica

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

Assim, as tetraciclina têm efeito bacteriostático, uma vez que inibem a síntese protéica dos microorganismos. Nestes microorganismos, podem, também, apresentar efeito bactericida (SADICK, 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, 2001b).

2.2.3. Efeitos adversos

As tetraciclinas podem causar vários efeitos adversos tais 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; também não é comum o aparecimento de diarreia (CHAMBERS, H.F., KAPUSNIK-UNER, J.E., SANDLE, M.A., 2000).

Em virtude do seu amplo espectro de ação, podem modificar a flora intestinal, levando a distúrbios gastrointestinais e a infecção pela *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 tido como uma reação fototóxica (CHAMBERS, 2001b). Estas reações de hipersensibilidade são raras, sendo que a fotossensibilizabilidade 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 gravidez, em pacientes com insuficiência hepática preexistente e atividade renal diminuída e quando são administradas altas doses de tetraciclina 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 tetraciclinas também podem provocar a pigmentação castanha dos dentes. Assim, quanto maior for a dose, mais intensa é a pigmentação do esmalte. Pode haver pigmentação permanente se o composto for absorvido entre o segundo mês de gestação e os cinco anos de idade, quando os dentes são calcificados (CHAMBERS, 2001b).

2.2.4. Uso das tetraciclinas em medicina veterinária e a sua associação às infecções podais

As tetraciclinas podem ser administradas tanto por via parenteral como por via oral, entretanto as doses terapêuticas por via oral não são usadas em ruminantes e eqüinos em virtude das alterações da microflora do trato digestório (SPINOSA, 1999a; TIMONEY, 1984).

A administração intramuscular das tetraciclinas é limitada devido à irritação tecidual e resposta inflamatória local. Na medicina veterinária são empregadas tanto a administração intravenosa como a intramamária (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 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 doxiclina é utilizada em casos de mastite de difícil tratamento, como aquelas causadas por *Nocardia spp* e *Clamidia* (COSTA, 1999), constituindo-se também de um potente agente eficaz contra *Pasteurella haemolytica* no tratamento de pneumonia em bovinos (MEIJER *et al*, 1993).

Nestes, a maior parte das claudicações são originadas de doenças podais onde é frequente a presença de microorganismos (CLARKSON *et al.*, 1996; DESROCHERS *et al.*, 1995; KOFLER, 1995; NAVARRE *et al.*, 1999; STANEK, 1994).

Nas doenças podais observa-se, freqüentemente, a ocorrência tanto de bactérias Gram positivas quanto negativas. A *Actinomyces pyogenes*, uma bactéria Gram negativa, aeróbica facultativa, é a mais comumente encontrada neste tipo de infecção, 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 & REDICKILL, 1997).

A escolha do antibiótico adequado deve levar em consideração 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).

A técnica da administração intravenosa regional em bovino é simples consistindo-se na aplicação de determinado medicamento na sinovia do animal, mediante a introdução prévia de um torniquete de borracha ao redor da extremidade do membro, na aplicação de anestésicos no interior de veias superficiais, geralmente nas Veias Dorsal Comum ou Abaxial Plantar Própria, distalmente ao torniquete. O torniquete pode ser mantido no local por até 90 minutos, praticamente sem o aparecimento de efeitos indesejáveis (ELMORE, 1980; THURMON & KO, 1997; WEAVER, 1972).

Os insucessos observados nos tratamentos das doenças podais dos bovinos, utilizando a administração parenteral de antimicrobianos, ocorrem, em parte à diminuição do pH tecidual causada pelos processos infecciosos, 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).

Dentre os antibióticos utilizados na administração intravenosa regional têm-se:
-Oxitetraciclina - 500 a 1000 mg diluídos ou não em 15 a 20 mL de lidocaína 2% sem vasoconstritor e administrado usualmente em dose única (HAUCK-BAUER, 1977).

-Penicilina Cristalina G sódica de até 10.000.000 U.I. (STANEK *et al.*, 1994).

O tratamento específico da doença de casco em gado bovino é realizado através da administração de tetraciclina de 500 a 1000 mg 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 do fármaco por via intravenosa ou intramuscular. Alguns dos efeitos indesejáveis observados através desta técnica são o edema moderado, sinais de inflamação e formação de hematomas especialmente no local da aplicação, principalmente 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.

Estudos mais recentes avaliaram a farmacocinética da cefazolina, administrada em dose única de 250 mg por via intravenosa regional, no líquido sinovial de vacas leiteiras híidas. Os resultados apontam elevadas

concentrações, acima da concentração inibitória (MIC), de cefazolina no líquido sinovial da articulação tibiotársica, durante as quatro primeiras horas de administração. As concentrações de cefazolina no líquido sinovial foram determinadas através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (GAGNON *et al.*, 1994).

Navarre *et al.* (1999) avaliaram a distribuição do ceftiofur sódico no plasma regional e líquido sinovial de vacas de corte híbridas, após a administração intravenosa regional na dose de 500 mg (2mL). Os resultados das concentrações no líquido sinovial e plasma regional apresentam níveis muito superiores ao MIC, persistindo por mais de 5 horas após a injeção do antibiótico ceftiofur. Contudo, o líquido sinovial não pode ser analisado em todos os momentos propostos, em virtude, principalmente, do posicionamento do torniquete no terço distal do metacarpo e, conseqüentemente, da colheita improdutiva e insuficiente deste líquido em punções sucessivas.

A administração intravenosa regional pode elevar a concentração do antibiótico no leite, acarretando, do ponto de vista toxicológico, uma cuidadosa avaliação dos teores residuais nesta matriz biológica.

2.2.5. Determinação de tetraciclina por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

As tetraciclinas apresentam estruturas contendo quatro anéis conjugados parcialmente com um grupo funcional carboxiamida. Correspondem a compostos anfóteros, 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 apresentam marcada absorção em torno de 270 e 360 nm em soluções ácidas e neutras (FEDENIUK & SHAND, 1998 ; OKA *et al*, 2000). Assim, OKA *et al* (2000) recomendaram a determinação nessa região do UV.

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) corresponde à técnica mais utilizada para a determinação de tetraciclinas em leite (SCHENCK & CALLERY, 1998; CINQUINA *et al*, 2003), entretanto, a possibilidade de medir o teor de tetraciclina em leite em parte 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 investigadas para a determinação de resíduos antimicrobianos em leite, entretanto, a sua sensibilidade precisa ser melhorada para a determinação de resíduos de derivados tetraciclínicos (ALTHAUS *et al*, 2003).

Em virtude dos diferentes grupos funcionais na sua molécula, o mecanismo pelo qual a substância é retida nos sistemas cromatográficos pode ser bastante complexo. Devido à alta polaridade das tetraciclinas, são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso. Em tais sistemas de fase, a formação de pares iônicos, a complexação e a forte interação com grupos silanóis residuais, desempenham importantes papéis, pois dificultam a quantificação das tetraciclinas (PENA *et al*, 1997).

Na análise cromatográfica desses compostos são utilizadas as colunas de fase reversa em que a fase estacionária permite a retenção das tetraciclinas através de alguns mecanismos, como a formação de pares iônicos, sítios de competição, sítios ativos e inativos, troca iônica e interação com grupos silanois (PENA *et al*, 1997).

As tetraciclinas quelam-se com íons metálicos e ligam-se à 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 outra 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, 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).

3. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo desenvolver uma metodologia para a determinação da concentração de tetraciclina por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência no plasma, líquido sinovial, além de analisar as concentrações correspondentes em leite, plasma e líquido sinovial de vacas submetidas ao tratamento intravenoso e intravenoso regional e sua implicação na presença de resíduos no leite.

Para tanto procedeu-se à:

- Revisão bibliográfica relacionada aos seguintes aspectos: a) Administração de tetraciclina em bovino leiteiro pelas vias intravenosa e intravenosa regional; b) Ocorrência de resíduos desse antibiótico no leite; c) Metodologia empregada nas análises do líquido sinovial, plasma e leite.
- Padronização e validação de métodos para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial, plasma e leite por CLAE com rearranjo de detector de diodo.
- Aplicação da metodologia proposta para a determinação de tetraciclina em amostras de líquido sinovial, plasma e leite de animais tratados com esta substância administrada por via intravenosa e intravenosa regional.
- Comparação dos resultados obtidos nos diversos substratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

O protocolo de trabalho previu:

- A administração do cloridrato de tetraciclina, por via intravenosa e intravenosa regional em 12 vacas híidas, em período de lactação, divididas em dois grupos:
 - O grupo 1 correspondeu a 6 vacas e a administração em dose única em uma concentração de 10 mg/kg corpóreo de cloridrato de tetraciclina cristalina (Talcin[®]) através de punção jugular e infusão contínua por, aproximadamente 10 minutos, do antimicrobiano.
 - O grupo 2 correspondeu a 6 vacas e a administração de cloridrato de tetraciclina na forma de solução (20 mL à 5%). Neste, previu-se o posicionamento de torniquetes de borracha, por 45 minutos, ao redor da tíbia esquerda, acima da tuberosidade do tarso calcâneo. Para assegurar o processo do garroteamento, também adiciona-se um rolo de gaze no sulco existente entre a tíbia e o tendão do músculo gastrocnêmico. A administração do fármaco foi efetuada de forma contínua através de escalpe 19G por venopunção da Veia Digital Dorsal Comum.
- Assepsia nos locais de aplicação do antibiótico do grupo 2 (veia Digital Dorsal Comum), bem como da região da colheita dos líquidos sinoviais de ambos os grupos, mais especificamente das articulações do tarso e

metatarsofalangeana do membro pélvico esquerdo), através da tricotomia e aplicação de solução tópica de polivinilpirrolidona (PVPI) 10%.

- Obtenção das amostras de sangue (5 mL), através de venopunção jugular, com auxílio de agulhas hipodérmicas descartáveis 40 x 12. Acondicionamento das amostras em frascos contendo EDTA como anticoagulante.

- Centrifugação das amostras de sangue, visando a obtenção do plasma, acondicionado em recipiente adequado e armazenado a - 20 °C.

- Coleta de frações de 1mL de líquido sinovial mediante antrocentese seriada, utilizando agulhas hipodérmicas descartáveis 30 X 10, a partir do tarso de todos os animais.

- Coletas de amostras de leite (10 mL) de todos os animais dos grupos 1 e 2 foram realizadas após higiene do úbere e dos tetos. As amostras foram colhidas nos seguintes tempos: antes da administração, 0,37, 0,75, 1,37, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-administração.

- Todas as amostras de sangue (plasma), líquido sinovial e leite colhido, acondicionados em recipiente limpos, fechados e posteriormente armazenados à temperatura - 20 °C por até 30 dias para posterior análise laboratorial.

A Figura 3 ilustra a divisão dos animais submetidos respectivamente aos tratamentos por tetraciclina intravenosa e intravenosa regional

Coleta das matrizes antes do tratamento, 0,37, 0,75, 1,37, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-administração.

Figura 3. Esquema do tratamento dos animais submetidos às administrações de cloridrato de tetraciclina por via intravenosa e intravenosa regional.

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

4.2. Material

4.2.1. 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 tetraciclina, teor 98,2%, fornecido pela UNIVET S.A. Indústria Veterinária
- Água Millipore[®] (Milli Q – resistividade > 16 megaOhm)
- Talcin[®] - NOVARTIS

4.2.2. Equipamentos, acessórios e vidraria

- Cromatógrafo a 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, 60A°, 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[®]
- Conjunto de Filtração à vácuo contendo: funil, base e tampa tubulada em borossilicato e garra de alumínio anodizado - Millipore[®]
- Filtro Millipore[®], membrana HV em PVDF 0,45 µm, 47 mm de diâmetro
- Centrífuga universal 16A, HETTICH[®]
- Seringa de vidro 5 mL, Becton Dickinson[®]
- Unidade Filtrante HV Millex e polietileno com membrana durapore 0,45 µm, 13 mm
- Tubos de centrífuga
- Pipetas automáticas Labsystems (volumes: 10-40 µl; 40-200µl; 200-1000µl e 1000-5000µl)
- Balões volumétricos (10, 25, 100 e 1000 mL)
- Béqueres
- Proveta (10, 100 e 1000 mL)
- Pipeta Pasteur

4.3. Métodos

4.3.1 Método analítico para a determinação de tetraciclina em leite

O método analítico adotado para a determinação de tetraciclina no leite de vacas sob o tratamento de tetraciclina foi o proposto por Furusawa (1999), modificado e validado em nosso laboratório por Denobile (2002).

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 tetraciclina em diferentes concentrações, no momento da análise.

4.3.1.1. Condições cromatográficas

As amostras de leite oriundas do tratamento de vacas em lactação com tetraciclina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sob 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: 1mL/min
- Comprimento de onda: 363 nm
- Tempo de corrida: 10 minutos
- Gradiente da fase Móvel, conforme descrito na Tabela 1

Tabela 1. Gradiente da fase móvel usada na detecção da tetraciclina em leite

Tempo (min.)	A (%)	B (%)	Fluxo (mL/min)
0	90	10	1
1	90	10	1
3	85	15	0,8
3,5	85	15	1
7	85	15	1
10	90	10	1

Fase Móvel: Solução A: Ácido Oxálico 0,01M: Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1);
Solução B: Acetonitrila 100%

4.3.1.2. Procedimento analítico

- Em um tubo de centrífuga foram adicionados 1000 μL da amostra de leite e 350 μL da solução de ácido tricloroacético à 80 % em acetonitrila;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Ultra-som por 10 min;
- Centrifugação a 2500 rpm (1600g) por 10 min;
- Filtração em filtro com membrana 0,45 μm , 13 mm;
- Injeção automática de 40 μl do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas no item 4.3.1.1.

A quantificação das amostras foi realizada através da confecção de uma curva de calibração descrita no item 4.3.1.3.2.

A Figura 4 ilustra a marcha analítica da extração de tetraciclina em leite

Figura 4. Marcha analítica utilizada na determinação de tetraciclina em leite

4.3.1.3. Parâmetros de validação

4.3.1.3.1. Linearidade

Para se avaliar o intervalo das concentrações em que a intensidade da resposta do detector é proporcional às concentrações consideradas (CHASIN *et al*, 1998), foi preparada uma curva de tetraciclina em leite abrangendo a seguinte faixa dinâmica: 50; 500; 1.000, 5.000, 10.000 e 15.000 ng/mL. Esses adicionados, juntamente com o branco foram analisados em seis replicatas.

4.3.1.3.2. Curva de calibração

Foram adicionadas à matriz em estudo, previamente testadas quanto a ausência de resíduos do analito, solução padrão de tetraciclina para se obter concentrações finais no leite de: 50; 1.000; 5.000 e 15.000 ng/mL.

Através da confecção de gráfico das concentrações versus a área do pico obteve-se a equação da reta.

4.3.1.4. Determinação da tetraciclina em amostras de leite coletadas após a administração por via intravenosa e intravenosa regional

As amostras de leite coletadas nos intervalos de tempo: zero; 0,37; 0,75; 1,37, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-administração foram analisadas

segundo o procedimento descrito em 4.3.1.2 para a determinação de tetraciclina. A concentração foi expressa em ng/mL.

4.3.2. Método analítico para a determinação de tetraciclina em plasma

4.3.2.1. Condições cromatográficas

As amostras de plasma que foram obtidas a partir do tratamento de vacas em lactação com tetraciclina 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: 5 minutos
- Gradiente da fase Móvel, descrito na Tabela 2

Tabela 2. Gradiente da fase móvel usada na detecção da tetraciclina em plasma.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)	Fluxo (ml/min)
0	90	10	1
1	90	10	1
3	85	15	0,8
3,5	85	15	1
5	85	15	1

Fase Móvel: Solução A: Ácido Oxálico 0,01M ; Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1);
Solução B: Acetonitrila 100%

4.3.2.2. Procedimento analítico

- Em um tubo de centrífuga foram adicionados 1000 µL das amostras de plasma coletados e 350 µl da solução de ácido tricloroacético à 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 40 µL do filtrado no CLAE segundo as condições mencionadas no item. 4.3.2.1.

A quantificação das amostras foi realizada através da confecção de uma curva de calibração descrita no item 4.3.2.3.5.

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

Figura 5. Marcha analítica utilizada na determinação de tetraciclina em plasma.

4.3.2.3. Validação do método

4.3.2.3.1. Limite de detecção

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, 2003b).

Essas análises do limite de detecção para a concentração foram realizadas em seis replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.2.2.

4.3.2.3.2. 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, 2003b).

As análises para a concentração foram realizadas em seis replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.2.2.

4.3.2.3.3. Recuperação

A recuperação do método para a extração de tetraciclina na amostra de plasma foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo cada tetraciclina, é submetida ao processo de extração, em relação a concentração obtida quando a amostra, sem a presença do analíto, é submetida ao processo de extração, onde no filtrado final obtido é adicionado o padrão de tetraciclina. As análises para cada concentração (50; 5.000 e 13.000 ng/mL) foram realizadas em dez replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.2.2.

A seguinte equação é utilizada para determinar a porcentagem de extração (CHASIN *et al*, 1998)

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

4.3.2.3.4. Estudo de linearidade

O estudo de linearidade do método que corresponde ao intervalo das concentrações em que a intensidade da resposta do detector é proporcional às concentrações consideradas (CHASIN *et al*, 1998); foi realizado através da adição de diferentes concentrações de tetraciclina às amostras de plasma e analisadas conforme procedimento descrito em 4.3.2.2.

Uma curva de tetraciclina em plasma foi construída abrangendo o seguinte intervalo de faixa dinâmica: 50; 500; 1.000; 5.000 e 13.000 ng/mL.

Estas amostras, juntamente com o branco, foram analisadas em seis replicatas.

4.3.2.3.5. Curva de calibração

Para o preparo da curva de calibração foram adicionadas as amostras de plasma, solução-padrão de tetraciclina, correspondentes às seguintes concentrações: 50; 1.000, 5.000 e 13.000 ng/mL. Tais amostras, assim como um branco de plasma, foram submetidas ao procedimento descrito em 4.3.2.2. e analisadas em três replicatas.

Através da confecção de gráfico das concentrações versus a área do pico obteve-se a equação da reta.

Para cada bateria de amostras analisadas foi confeccionada uma curva de calibração correspondente.

4.3.2.3.6. Precisão

A precisão do método analítico corresponde ao parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ou reprodutibilidade (CHASIN *et al*, 1998). Para avaliar a precisão, amostras de plasma enriquecidas com três concentrações diferentes de tetraciclina: 50; 5.000 e 13.000 ng/mL, foram preparadas e analisadas em seis replicatas, conforme procedimento descrito em 4.3.2.2., em um único dia para o estabelecimento da precisão intra-ensaio e em três dias consecutivos, para a precisão inter ensaio.

4.3.2.3.7. 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 de plasma enriquecidas com três concentrações diferentes: 50, 5.000 e 13.000 ng/mL de tetraciclina foram preparadas e em seguida analisadas em seis replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 4.3.2.2.

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

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

4.3.2.3.8. Estabilidade do analito na amostra

As amostras de pool de plasma enriquecidas com duas concentrações diferentes: 50 e 13.000 ng/mL de tetraciclina foram preparadas e armazenadas em alíquotas num período de 3 meses a -20°C (freezer), e posteriormente analisadas conforme procedimento descrito no item 4.3.2.2. Esses valores foram comparados com as concentrações obtidas no tempo zero de armazenamento (CHASIN *et al*, 1994).

4.3.2.4. Análise das amostras de plasma coletadas após as administrações por via intravenosa e intravenosa regional

As amostras de plasma coletadas nos intervalos de tempo: zero; 0,37; 0,75; 1,37; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72; 96 e 120 horas pós-administração foram analisadas segundo o procedimento descrito em 4.3.2.2. para a determinação de tetraciclina; a concentração foi expressa em ng/mL.

4.3.3. Método analítico para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial

4.3.3.1. Condições cromatográficas

As amostras de líquido sinovial que foram obtidas à partir do tratamento de vacas em lactação com tetraciclina 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: 6 minutos
- Gradiente da fase Móvel, conforme a Tabela 3

Tabela 3. Gradiente da fase móvel usada na detecção da tetraciclina em líquido sinovial.

Tempo (min.)	A (%)	B (%)	Fluxo (ml/min)
0	90	10	1
1	90	10	1
3	85	15	0,8
3,5	85	15	1
6	90	10	1

Fase Móvel: Solução A: Ácido Oxálico 0,01M ; Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1);
Solução B: Acetonitrila 100%

4.3.3.2. Procedimento analítico

- Em um tubo de centrífuga foram adicionados 500 µl das amostras de líquido sinovial e 500 µL da solução de ácido tricloroacético a 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 0,45 μ m, 13 mm;
- Injeção automática de 40 μ l do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas no item. 4.3.3.1

A quantificação da tetraciclina das amostras foi realizada através da confecção de uma curva de calibração descrita no item 4.3.3.3.5.

A Figura 6 ilustra a marcha analítica da extração de tetraciclina em líquido sinovial

Figura 6. Marcha analítica utilizada na determinação de tetraciclina em líquido sinovial.

4.3.3.3. Validação do método

4.3.3.3.1. Limite de detecção

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, 2003b).

As análises para a concentração foram realizadas em seis replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.2.

4.3.3.3.2. 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, 2003b).

As análises para a concentração foram realizadas em seis replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.2.

4.3.3.3.3. Recuperação

A recuperação da extração de tetraciclina na amostra de líquido sinovial foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo cada tetraciclina, é submetida ao processo de extração, em relação à concentração obtida quando a amostra, sem a presença do analíto, é submetida

ao processo de extração onde é adicionado o padrão de tetraciclina no filtrado final. As análises para cada concentração (50; 500 e 1000 ng/mL) foram realizadas em dez replicatas, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.2.

A seguinte equação é utilizada para determinar a porcentagem de extração (CHASIN *et al*, 1998)

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

4.3.3.3.4. Estudo de linearidade

O estudo de linearidade do método, que corresponde ao intervalo das concentrações em que a intensidade da resposta do detector é proporcional às concentrações consideradas (CHASIN *et al*, 1998), foi realizado através da adição de diferentes concentrações de tetraciclina às amostras de líquido sinovial e analisado conforme procedimento descrito em 4.3.3.2.

As curvas de tetraciclina em líquido sinovial foram construídas abrangendo os seguintes intervalos de faixa dinâmica: 50, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 15.000 ng/mL e 15, 50, 100, 200, 415 µg/mL. Estas amostras, juntamente com o branco, foram analisadas em seis replicatas.

4.3.3.3.5. Curva de calibração

Para o preparo das duas curvas de calibração foram adicionadas às amostras de líquido sinovial, solução-padrão de tetraciclina, para se obter as seguintes concentrações: 50, 1.000, 5.000, 15.000 ng/mL e 15, 100, 200, 415 µg/mL.

Tais amostras, assim como um branco de líquido sinovial, foram submetidas ao procedimento descrito em 4.3.3.2 e analisadas em três replicatas.

Através da confecção de gráfico das concentrações versus a área do pico obteve-se a equação da reta.

Para cada bateria de amostras analisadas foi confeccionada uma curva de calibração correspondente.

4.3.3.3.6. Precisão

A precisão do método analítico corresponde ao parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ou reprodutibilidade (CHASIN *et al*, 1998). Para avaliar a precisão, amostras de plasma enriquecidas com três concentrações diferentes de tetraciclina: 50; 10.000 e 415.000 ng/mL, foram preparadas e analisadas em seis replicatas, conforme procedimento 4.3.3.2, em um único dia para o estabelecimento da precisão intra-ensaio, e em três dias consecutivos, para a precisão inter ensaio.

4.3.3.3.7. 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 de líquido sinovial enriquecidas com três

concentrações diferentes: 50; 10.000 e 415.000 ng/mL de tetraciclina foram preparadas e em seguida analisadas em seis replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 4.3.3.2.

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

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

4.3.3.3.8. Estabilidade do analito na amostra

As amostras de pool de plasma enriquecidas com duas concentrações diferentes: 50 e 415.000 ng/mL de tetraciclina foram preparadas e armazenadas em alíquotas num período de 3 meses a -20°C (freezer), e após analisadas conforme procedimento descrito no item 4.3.3.2. Os valores obtidos foram comparados com as concentrações obtidas no tempo zero de armazenamento (CHASIN *et al*, 1994).

4.3.3.4. Análise das amostras de líquido sinovial coletadas após as administrações intravenosa e intravenosa regional

As amostras de líquido sinovial coletadas nos intervalos de tempo: zero; 0,37; 0,75; 1,37; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-administração foram analisadas segundo o procedimento descrito em 4.3.3.2 para a determinação de tetraciclina; a concentração foi expressa em ng/mL.

5. RESULTADOS

5.1. Leite

Com exceção dos parâmetros 5.1.1. (linearidade) e 5.1.2 (perfil cromatográfico), os demais resultados aqui citados foram objeto de estudo da dissertação de Denobile (2002) que validou o método nas mesmas condições cromatográficas e de equipamentos utilizados neste trabalho. Os limites de detecção e de quantificação do método foram de 37,5 e 50 ng/mL, respectivamente. A precisão do método mostrou os respectivos valores de coeficientes de variação inferiores a 10% e 5% para as maiores e menores concentrações. A recuperação foi de 86,6% e exatidão de 99,37%.

5.1.1. Linearidade

A Figura 7 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de um pool de leite com as seguintes concentrações de tetraciclina: 50; 500; 1.000; 5.000; 10.000 e 15.000 ng/mL.

Figura 7. Representação gráfica da linearidade da tetraciclina (50 - 15.000 ng/mL) em leite

5.1.2. Perfil cromatográfico

A Figura 8 ilustra o perfil cromatográfico obtido nas análises do pool de leite adicionado de tetraciclina.

Figura 8. Perfil cromatográfico da tetraciclina (2.700 ng/mL) em leite.

5.1.3. Determinação de tetraciclina no leite de vacas em lactação submetidas aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional

As amostras de leite foram analisadas segundo o procedimento especificado no item 4.3.1.2. A concentração foi expressa em ng/mL.

5.1.3.1. Animais submetidos ao tratamento intravenoso

A Tabela 4 apresenta os dados obtidos de concentrações de tetraciclina em amostras de leite, através da análise conforme procedimento 4.3.1.2.

As amostras M0 a M14 seguiram o protocolo descrito no item 4.1.

Tabela 4. Concentração de tetraciclina em leite em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso

CONCENTRAÇÃO (ng/mL)									
Tempo pós-administração (horas)	Animal 136	Animal 329	Animal 349	Animal 311	Animal 337	Animal 358	Média	DP	CV (%)
M0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 (0,37)	1.101,95	264,56	452,67	210,08	378,08	291,81	486,92	355,66	73,04
M2 (0,75)	2.876,62	1.594,26	2.101,50	468,88	1.551,46	725,09	1.552,97	884,90	56,98
M3 (1,37)	3.484,39	4.838,74	3.053,69	1.214,17	3.902,76	5.063,81	3.592,93	1.398,04	38,91
M4 (2)	3.825,57	7.447,54	3.880,70	2.453,06	4.085,67	6.932,53	4.770,85	1.968,00	41,25
M5 (3)	4.142,75	7.406,68	4.439,83	3.073,15	4.725,22	6.807,99	5.099,27	1.663,65	32,63
M6 (4)	4.580,58	7.154,36	6.472,00	3.325,47	5.494,50	7.875,64	5.817,09	1.690,92	29,07
M7 (6)	5.261,00	6.763,23	7.502,68	4.165,45	5.098,84	7.865,91	6.109,52	1.481,49	24,25
M8 (8)	5.998,49	6.077,63	7.376,84	3.959,84	4.691,50	8.966,00	6.178,38	1.810,10	29,30
M9 (12)	5.693,64	5.464,02	6.045,84	4.135,81	3.952,70	7.562,35	5.475,73	1.329,78	24,29
M10 (24)	3.330,66	2.678,13	2.290,90	1.635,78	1.722,05	4.880,25	2.756,30	1.215,65	44,10
M11 (48)	1.041,63	682,28	507,15	448,13	570,72	841,20	681,85	224,65	32,95
M12 (72)	249,00	320,35	205,54	252,24	215,92	339,81	263,81	54,80	20,77
M13 (96)	184,78	209,43	191,27	192,57	190,62	219,16	197,97	13,28	6,71
M14 (120)	-	186,08	185,43	183,48	170,51	206,84	155,39	77,01	49,56

(-) Abaixo do limite de detecção

5.1.3.2. Animais submetidos ao tratamento intravenoso regional

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos através da análise conforme procedimento 4.3.1.2.

As amostras M0 a M14 relacionam-se às amostras submetidas ao procedimento descrito no item 4.1.

Tabela 5. Concentração de tetraciclina em leite em diferentes tempos (0 –120 h) após tratamento intravenoso regional.

CONCENTRAÇÃO (ng/mL)									
Tempo pós-administração (horas)	Animal 135	Animal 140	Animal 301	Animal 307	Animal 366	Animal 335	Média	DP	CV (%)
M0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 (0,37)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2 (0,75)	201,00	-	-	-	-	284,02	80,84	127,95	158,29
M3 (1,37)	279,48	241,21	202,94	292,46	300,24	361,86	279,70	54,24	19,39
M4 (2)	612,88	322,29	448,13	410,51	406,61	673,20	478,94	134,97	28,18
M5 (3)	619,37	445,53	522,07	451,37	486,40	909,31	572,34	176,85	30,90
M6 (4)	680,34	514,94	813,96	491,59	513,64	961,85	662,72	192,88	29,10
M7 (6)	714,72	888,55	660,23	490,94	644,02	1.194,06	765,42	246,01	32,14
M8 (8)	695,26	766,61	559,04	463,69	715,37	937,85	689,64	165,13	23,94
M9 (12)	682,93	893,74	934,60	394,29	948,87	847,04	783,58	213,53	27,25
M10 (24)	370,94	516,88	538,94	269,75	549,31	859,36	517,53	200,60	38,76
M11 (48)	317,10	251,59	213,32	251,59	192,57	267,16	248,89	43,45	17,46
M12 (72)	193,21	185,43	224,37	171,16	-	202,30	162,75	81,68	50,19
M13 (96)	178,94	177,65	-	-	-	175,05	88,61	97,07	109,55
M14 (120)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) abaixo do limite de detecção

A Figura 9 ilustra as concentrações de resíduos de tetraciclina em leite em função do tempo de análise após administração intravenosa e intravenosa regional.

Figura 9. Concentração do resíduo de tetraciclina em leite x tempo após administrações intravenosa e intravenosa regional.

5.2. Plasma

5.2.1. Limite de detecção

O limite de detecção do método para a tetraciclina em plasma é de 37 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 15,40% e desvio padrão de 0,14.

5.2.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para a tetraciclina em plasma é de 50 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 9,33% e desvio padrão de 0,16.

5.2.3. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a tetraciclina em plasma são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Recuperação da tetraciclina em plasma

Concentração de tetraciclina em plasma (ng/mL)	Recuperação *%	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
50	75,72	0,22	10,69
5.000	83,52	0,90	2,81
13.000	77,14	2,82	4,60

* Média dos valores das análises em seis replicatas

5.2.4. Linearidade

A Figura 10 ilustra a linearidade obtida pelo enriquecimento de um pool de plasma com as seguintes concentrações: 50; 250; 500; 1.000; 5.000, 13.000 ng/mL de tetraciclina.

Figura 10. Representação gráfica da linearidade da tetraciclina (50-13.000 ng/mL) em plasma

5.2.5. Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra e inter ensaios para as amostras de plasma adicionadas de tetraciclina são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Precisão intra e inter ensaios para a determinação de tetraciclina em plasma.

Conc. de tetraciclina em plasma (ng/mL)	Precisão intra-ensaio*		Precisão inter ensaio (3dias)*	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
50	5,21	0,08	7,78	0,13
5.000	6,55	15,79	7,44	18,08
13.000	3,49	20,12	2,72	15,39

* Média dos valores das análises em seis replicatas

5.2.6. Exatidão

A exatidão do método, representada pela tendenciosidade, através do cálculo da inexatidão (CHASIN *et al*, 1998), é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de inexatidão para a determinação de tetraciclina em plasma

Concentração de tetraciclina em plasma (ng/mL)	Inexatidão (%)*
50	-5,74
5.000	14,97
13.000	7,13

*Média dos valores das análises em seis replicatas

5.2.7. Perfil cromatográfico

A Figura 11 ilustra o perfil cromatográfico obtido nas análises do pool de plasma adicionado de tetraciclina.

Figura 11. Perfil cromatográfico da tetraciclina (5.000 ng/mL) em plasma.

5.2.8. Estabilidade

Os resultados o estudo de estabilidade das amostras de tetraciclina nas concentrações 50 e 13.000 ng/mL após 90 dias em freezer , são apresentadas na Tabela 9. As concentrações obtidas se referem a média da determinação da tetraciclina realizadas em seis replicatas.

Tabela 9. Análise da estabilidade da teraciclina em plasma, nas concentrações de 50 e 13.000 ng/mL conservadas a -20°C (freezer)

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração no tempo zero (ng/mL)*	Concentração após 90 dias (ng/mL)*	CV (%)
50	57,10	46,9	15,40
13.000	14.626,35	12.727,10	10,55

* Média dos valores das análises em seis replicatas

5.2.9. Determinação de tetraciclina no plasma de vacas submetidas aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional

As amostras foram analisadas segundo o procedimento especificado no item 4.3.2.2. A concentração foi expressa em ng/mL.

5.2.9.1. Animais submetidos ao tratamento intravenoso

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos de concentrações de tetraciclina em amostras de plasma através das análises realizadas de acordo com o procedimento descrito em 4.3.2.2.

As amostras M0 a M14 relacionam às amostras submetidas ao protocolo descrito no item 4.1.

Tabela 10. Concentração de tetraciclina no plasma em diferentes tempos (0 - 120 h) após tratamento intravenoso.

Tempo pós-administração (horas)	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)						Média	DP	CV (%)
	Animal 136	Animal 329	Animal 349	Animal 311	Animal 337	Animal 358			
M0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 (0,37)	9.343,11	12.963,32	10.108,72	9.147,71	12.220,81	10.193,98	10.662,94	1.567,40	14,70
M2 (0,75)	6.946,80	8.728,49	6.412,12	7.893,60	8.906,12	7.024,96	7.652,02	1.021,55	13,35
M3 (1,37)	5.639,40	7.177,73	5.843,68	4.843,60	6.650,15	5.156,23	5.885,13	887,05	15,07
M4 (2)	4.689,05	6.216,72	4.419,05	3.998,05	5.324,99	4.806,29	4.909,03	776,14	15,81
M5 (3)	3.868,38	5.339,20	4.385,30	2.957,11	4.653,53	3.871,93	4.179,24	812,11	19,43
M6 (4)	3.339,02	4.410,17	3.941,21	2.699,53	3.678,31	3.339,02	3.567,88	586,48	16,44
M7 (6)	2.413,54	4.216,54	2.783,02	1.829,12	2.582,29	2.987,30	2.801,97	797,66	28,47
M8 (8)	1.836,22	3.276,85	2.139,98	1.717,21	1.919,71	2.690,65	2.263,44	603,95	26,68
M9 (12)	1.273,12	2.555,65	1.612,40	1.205,62	1.139,89	2.044,06	1.638,46	561,40	34,26
M10 (24)	418,69	1.154,10	537,71	319,22	267,70	898,31	599,29	352,71	58,86
M11 (48)	-	269,48	68,75	113,16	-	116,71	94,68	99,98	105,59
M12 (72)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13 (96)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14 (120)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Abaixo do limite de detecção

5.2.9.2. Animais submetidos ao tratamento intravenoso regional

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos de concentrações de tetraciclina em amostras de plasma através das análises realizadas de acordo com o procedimento descrito em 4.3.2.2.

As amostras M0 a M14 relacionam às amostras submetidas ao protocolo descrito no item 4.1.

Tabela 11. Concentração de tetraciclina no plasma em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso regional.

CONCENTRAÇÃO (ng/mL)									
Tempo pós-administração (horas)	Animal 135	Animal 140	Animal 301	Animal 307	Animal 366	Animal 335	Média	DP	CV (%)
M0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 (0,37)	-	-	-	235,73	-	670,93	151,11	271,55	179,70
M2 (0,75)	-	596,33	-	185,99	-	487,97	211,71	268,09	126,63
M3 (1,37)	214,41	935,61	502,18	553,69	681,59	757,98	607,58	246,70	40,60
M4 (2)	166,45	235,73	511,06	583,89	562,58	576,79	439,42	187,64	42,70
M5 (3)	155,79	576,79	372,51	413,36	495,07	532,38	424,32	151,55	35,72
M6 (4)	120,26	456,00	342,31	406,26	463,10	498,63	381,09	138,80	36,42
M7 (6)	102,50	310,33	271,25	251,71	241,06	361,85	256,45	87,40	34,08
M8 (8)	82,96	237,50	217,96	210,86	161,12	265,92	196,05	65,28	33,30
M9 (12)	61,64	154,01	178,88	120,26	170,00	185,99	145,13	47,11	32,46
M10 (24)	-	-	-	-	-	65,20	10,87	26,62	244,95
M11 (48)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12 (72)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13 (96)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14 (120)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Abaixo do limite de detecção

A Figura 12 ilustra as concentrações do resíduo de tetraciclina em plasma x tempo de colheita de amostras após administrações intravenosa e intravenosa regional.

Figura 12. Concentração de tetraciclina no plasma x tempo de colheita de amostras após administrações intravenosa e intravenosa regional.

5.3. Líquido sinovial

5.3.1. Limite de detecção

O limite de detecção do método para a tetraciclina em líquido sinovial é de 38 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 19,15% e desvio padrão de 0,39.

5.3.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para a tetraciclina em líquido sinovial é de 50 ng/mL, apresentando um coeficiente de variação de 9,51% e desvio padrão de 0,28.

5.3.3. Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a tetraciclina em líquido sinovial são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Recuperação da tetraciclina em líquido sinovial

Concentração de tetraciclina em líquido sinovial (ng/mL)	Recuperação *%	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
50	98,88	0,26	9,44
10.000	99,28	26,83	4,48
415.000	98,10	1374	5,44

* Média dos valores das análises em seis replicatas

5.3.4. Linearidade

A Figura 13 ilustra respectivamente a linearidade obtida pelo enriquecimento de um *pool* de líquido sinovial com as seguintes concentrações: 50, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 15.000 ng/mL de tetraciclina (Fig. 13A) e 15, 50, 100, 200, 415 µg/mL de tetraciclina (Fig. 13B).

Figura 13. Representação gráfica da linearidade da tetraciclina em líquido sinovial. (A) 50-15.000 ng/mL. (B) 15 - 415 µg/mL.

5.3.5. Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra e inter ensaios para as amostras de líquido sinovial adicionadas de tetraciclina são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Precisão intra e inter-ensaios para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial.

Conc. de tetraciclina em líquido sinovial (ng/mL)	Precisão intra-ensaio*		Precisão inter ensaio (3 dias)*	
	CV (%)	DP	CV (%)	DP
50	9,64	0,28	6,58	0,18
10.000	8,87	50,22	1,99	11,96
415.000	5,55	1.410,74	3,85	1.023,37

* Média dos valores das análises em seis replicatas

5.3.6. Exatidão

A exatidão do método é representada pela tendenciosidade, através do cálculo da inexatidão (CHASIN *et al*, 1998), apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. Porcentagem de inexatidão para a determinação de tetraciclina em líquido sinovial

Concentração de tetraciclina em plasma (ng/mL)	Inexatidão (%)*
50	-7,96
10.000	-5,77
415.000	-1,22

*Média dos valores das análises em seis replicatas

5.3.7. Perfil cromatográfico

A Figura 14 ilustra o perfil cromatográfico obtido nas análises do pool de líquido sinovial adicionados de tetraciclina.

Figura 14. Perfil cromatográfico da tetraciclina (5.000 ng/mL) em líquido sinovial.

5.3.8. Estabilidade do analito na amostra

Os resultados do estudo de estabilidade das amostras de tetraciclina em líquido sinovial nas concentrações 50 e 415.000 ng/mL após 90 dias em freezer , são apresentadas na Tabela 15. As concentrações obtidas se referem a média da determinação da tetraciclina realizadas em seis replicatas.

Tabela 15. Análise da estabilidade da tetraciclina em líquido sinovial, nas concentrações de 50 e 415.000 ng/mL conservadas a -20 °C (freezer) por 3 meses.

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração no tempo zero (ng/mL)*	Concentração após 90 dias (ng/mL)*	CV (%)
50	53,47	45,8	11,84
415.000	409.942	382.866	5,00

* Média dos valores das análises em seis replicatas

5.3.9. Determinação de tetraciclina no líquido sinovial de bovino leiteiro submetidos aos tratamentos intravenoso e intravenoso regional

As amostras foram analisadas segundo o procedimento especificado no item 4.3.3.2. A concentração foi expressa em ng/mL.

5.3.9.1. Animais submetidos ao tratamento intravenoso

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos de concentrações de tetraciclina em amostras de líquido através da análise conforme procedimento 4.3.3.2.

As amostras M0 a M14 relacionam-se às amostras submetidas ao procedimento descrito no item 4.1.

Tabela 16. Concentração de tetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0 - 120 h) após tratamento intravenoso.

Tempo pós-administração (horas)	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)						Média	Desv. Pad.	CV (%)
	Animal 136	Animal 329	Animal 349	Animal 311	Animal 337	Animal 358			
M0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 (0,37)	-	1.659,28	2.410,15	678,31	145,44	1.712,92	1.101,02	969,94	88,10
M2 (0,75)	2.759,63	3.366,90	3.737,14	813,26	453,40	3.247,52	2.396,31	1.405,52	58,65
M3 (1,37)	4.133,33	3.929,18	5.915,34	932,64	571,05	5.347,87	3.471,57	2.236,02	64,41
M4 (2)	1.934,37	1.638,52	2.041,64	882,47	1.204,27	1.598,73	1.550,00	439,27	28,34
M5 (3)	1.427,45	733,68	448,21	1.107,38	738,87	943,02	899,77	340,82	37,88
M6 (4)	773,47	569,32	1.394,58	1.010,49	565,86	546,83	810,09	337,65	41,68
M7 (6)	216,38	128,14	731,95	1.091,81	562,40	214,65	490,89	376,19	76,63
M8 (8)	-	-	491,46	932,64	432,64	102,19	326,49	365,89	112,07
M9 (12)	-	-	-	356,52	173,12	-	88,27	148,54	168,27
M10 (24)	-	-	-	162,74	-	-	27,12	66,44	244,95
M11 (48)	-	-	-	97,00	-	-	16,17	39,60	244,95
M12 (72)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13 (96)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14 (120)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Abaixo do limite de detecção

5.3.9.2. Animais submetidos ao tratamento intravenoso regional

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos de concentrações de tetraciclina em amostras de líquido sinovial através da análise conforme procedimento 4.3.3.2.

As amostras M0 a M14 relacionam-se às amostras submetidas ao procedimento descrito no item 4.1.

Tabela 17. Concentração de tetraciclina no líquido sinovial em diferentes tempos (0 – 120 h) após tratamento intravenoso regional.

CONCENTRAÇÃO (ng/mL)									
Tempo pós-administração (horas)	Animal 135	Animal 140	Animal 301	Animal 307	Animal 366	Animal 335	Média	Desv. Pad.	CV (%)
M0 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1 (0,37)	2.247,52	261.922,30	18.358,20	2.026,07	1.429,18	2.472,43	48.075,95	104.966,51	218,33
M2 (0,75)	263.565,86	362.216,40	317.458,60	364.880,74	410.003,57	198.306,34	343.625,03	55.447,51	16,14
M3 (1,37)	118.237,14	189.339,20	217.787,30	93.098,73	112.700,81	122.147,17	142.218,39	49.382,21	34,72
M4 (2)	92.960,32	130.880,70	154.379,00	70.036,45	78.783,85	74.154,09	100.199,07	34.571,56	34,50
M5 (3)	53.340,94	116.135,10	99.534,70	68.340,94	21.029,53	36.019,15	65.733,39	36.673,16	55,79
M6 (4)	41.818,45	94.064,10	63.514,00	36.161,01	27.238,87	28.832,29	48.604,79	25.834,82	53,15
M7 (6)	27.126,87	63.633,30	41.022,60	23.998,38	17.114,30	16.569,32	31.577,96	18.046,82	57,15
M8 (8)	10.034,72	40.986,30	26.437,80	13.410,15	3.368,63	7.185,24	16.903,81	14.197,92	83,99
M9 (12)	2.211,19	10.178,30	11.749,20	2.250,98	1.256,17	3.152,36	5.133,03	4.583,12	89,29
M10 (24)	76,24	1.162,70	1.043,40	328,83	214,65	86,62	485,41	488,74	100,69
M11 (48)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M12 (72)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13 (96)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14 (120)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) Abaixo do limite de detecção

A Figura 15 ilustra as concentrações do resíduo de tetraciclina em líquido sinovial x tempo de colheita das amostras após administrações intravenosa e intravenosa regional.

Figura 15. Concentração de tetraciclina no líquido sinovial x tempo de colheita das amostras após administrações intravenosa e intravenosa regional.

As Figuras 16 e 17 ilustram respectivamente a concentração de tetraciclina nos tempos analisados neste experimento tanto pela via intravenosa como para a via intravenosa regional considerando as diferentes matrizes biológicas.

Figura 16. Concentração de tetraciclina x tempo de colheita das amostras por administração intravenosa.

Figura 17. Concentração de tetraciclina x tempo de colheita das amostras após administração intravenosa regional.

6. DISCUSSÃO

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

Os resultados obtidos nas análises das outras matrizes biológicas, ou seja, plasma e líquido sinovial, nos fornecem sustentação e confirmação das hipóteses levantadas durante o estudo e serão objeto de estudo e discussão do projeto de doutorado de Celso Antonio Rodrigues junto à Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – UNESP.

No Brasil, o Ministério da Agricultura através do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), visa sistematizar os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso na agropecuária, como também os poluentes ambientais (BRASIL, 1998). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece como limite máximo de resíduo (LMR) a quantidade de 100 ppb para a tetraciclina em leite (BRASIL, 2003a).

Os resultados obtidos nos diferentes parâmetros de validação dos métodos analíticos utilizados, com suas respectivas condições cromatográficas,

permitem assegurar resultados confiáveis para as diferentes matrizes biológicas estudadas neste trabalho.

As amostras de leite provenientes de animais tratados com o medicamento pela via intravenosa regional, não apresentaram resíduos de tetraciclina após 120 horas da administração do medicamento. Os valores também foram negativos para plasma e líquido sinovial após 48 horas por esta via de administração.

Através da administração do medicamento por via intravenosa, foram observados resíduos em leite em todos dos tempos avaliados neste trabalho exceto no caso de um animal, onde observou-se resíduo até 96 horas após o tratamento. Não foi constatada a presença do princípio ativo tanto no plasma como no líquido sinovial após 72 horas do tratamento por via intravenosa.

Os dados obtidos tanto nas amostras de plasma quanto nas de líquido sinovial permitem afirmar que através da administração do cloridrato de tetraciclina por via intravenosa regional, há menor disponibilidade do fármaco na circulação sistêmica, resultando em maior concentração do princípio ativo até 24 horas pós-aplicação, se comparado com a via intravenosa. Estes dados sugerem uma condição favorável ao tratamento dos animais pertencentes a este grupo, podendo até mesmo reduzir o tempo de tratamento.

Através da análise do gráfico apresentado na Figura 9, ilustrando a concentração da tetraciclina x tempo no leite após tratamento intravenoso e intravenoso regional, observa-se uma concentração de cerca de 6 vezes maior até aproximadamente 20 horas após o tratamento do medicamento por via

intravenosa do que por via intravenosa regional, sendo que após 60 horas do tratamento os valores para ambos são muito próximos. Além disso, a ausência de resíduos de tetraciclina em leite, em todos os animais avaliados, após 120 horas de tratamento pelo medicamento por via intravenosa regional, constitui-se numa vantagem se comparado pela via intravenosa onde estes valores estavam, exceto a um animal, acima dos teores estabelecidos pela legislação brasileira (100 ppb). Desta forma, o período de carência seria menor para animais tratados pela primeira via de administração, oferecendo uma vantagem econômica aos produtores de leite e à indústria de laticínios, uma vez que seriam evitados prejuízos decorrentes de possíveis interferências do referido antibiótico no processo de produção de derivados.

Na Figura 12 observa-se que a concentração da tetraciclina no plasma é muito superior até 20 horas após tratamento do antibiótico por via intravenosa do que para a via intravenosa regional, após 40 horas os valores tendem a se aproximar.

Na Figura 15 é possível observar os valores sensivelmente superiores, até aproximadamente 10 horas, após tratamento dos animais com o medicamento administrado por via intravenosa regional do que pela via intravenosa. Após 20 horas estes valores tornam-se muito próximos.

Um fato que despertou atenção foram os elevados valores de coeficiente de variação apresentados entre os animais pertencentes ao mesmo grupo. Essa variação poderia estar associada às características individuais tais como, peso do animal, produção e qualidade do leite, peso corpóreo, idade, entre outros fatores, além dos erros sistemáticos. Assim, seria recomendado o tratamento

estatístico para analisar as diversas variáveis presentes neste trabalho, o que será realizado pelo médico veterinário Celso Rodrigues em sua tese de doutorado.

Dados como os apresentados da análise do leite após 0,75 h da aplicação intravenosa regional do fármaco (Tabela 5), mostrou um elevado coeficiente de variação em virtude de apenas 2 animais apresentarem valores residuais de tetraciclina acima do limite de quantificação, ao passo que os demais apresentaram valores inferiores ao limite de detecção do método utilizado. O mesmo ocorreu após 96 horas de pós-tratamento por esta via, onde 3 animais apresentaram valores residuais acima do limite de quantificação e os demais não apresentaram resíduos do fármaco. Após 120 horas de tratamento, todos os animais submetidos ao tratamento intravenoso regional não apresentaram valores residuais do referido antibiótico em leite enquanto que para a via intravenosa (Tabela 4), todos os demais apresentaram valores superiores ao preconizado como limite máximo permitido (100 ppb), exceto no animal de número 136.

Com relação às amostras de plasma, a maior variação ocorreu após 48h de tratamento por via intravenosa (Tabela 10), uma vez que apenas 4 animais apresentaram valores residuais, acima do limite de quantificação, enquanto que os demais encontravam-se abaixo do limite de detecção do método. Já para a via intravenosa regional (Tabela 11), houve elevada variação após 0,37 e 0,75 h de tratamento do fármaco, motivado, principalmente, pelos diferentes valores apresentados pelos animais. Observou-se, também, alta variação 24 h após administração, devido a apenas o animal 335 apresentar valores da substância acima do limite de quantificação.

Os resultados obtidos nas análises do líquido sinovial através do tratamento intravenoso apresentaram variações elevadas (Tabela 16). As maiores variações foram observadas após 24 e 48 horas pós-tratamento, uma vez que apenas o animal de numeração 311 apresentou resíduos do antibiótico estudado acima do valor de limite de quantificação do método. Para a via intravenosa regional (Tabela 17), a maior variação ocorreu após 48 h do tratamento em virtude de apenas o animal 140 apresentar traços do fármaco, sendo que os demais apresentaram resultados inferiores ao limite de detecção. Esta variação é seguida após 0,37 h da aplicação do medicamento, uma vez que o animal 140 apresentou valor do antibiótico cerca de 100 vezes maior do que os demais animais avaliados neste momento, elevando sensivelmente o coeficiente de variação. Esta diferença foi minimizada nos outros momentos avaliados, indicando uma possível aplicação mais eficiente para este animal, já que o antibiótico estava presente em uma concentração considerável logo após a administração do medicamento. Ainda pode-se considerar que a coleta do fluido neste animal foi mais homogênea se comparado com os demais.

Do ponto de vista de saúde pública, a presença do resíduo de antibiótico no leite, constitui-se de uma problemática de suma importância uma vez que pode ocasionar várias reações indesejáveis aos indivíduos, como as reações de hipersensibilidade, a seleção de microorganismos patogênicos resistentes entre outros. Também deve ser considerado que a idade do usuário para este tipo de alimento é de relevância a algumas reações adversas aos antibióticos, desta forma, a presença deste resíduo em leite, que é consumido principalmente na infância, assume extrema importância (COSTA, 1999). Assim, torna-se fundamental seguir a orientação dos órgãos públicos e respeitar o período de carência até que estes valores estejam dentro dos limites máximos permitidos.

7. CONCLUSÕES

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

√ A administração do medicamento por via intravenosa regional permite encontrar uma baixa disponibilidade do fármaco na circulação sistêmica e maior concentração na sinovia dos animais, até 24 horas após tratamento por esta via se comparado com via intravenosa, sugerindo uma condição favorável ao tratamento dos animais submetidos à administração intravenosa regional, podendo até mesmo reduzir o tempo de tratamento;

√ Para a aplicação do medicamento pelas vias intravenosa e intravenosa regional foram observadas, após a colheita do líquido sinovial, a presença do antibiótico no sítio de ação até 48 e 24 horas, respectivamente;

√ As amostras de leite provenientes de animais tratados pela via intravenosa regional não apresentaram resíduos de tetraciclina após 120 horas de administração, ao passo que para a via intravenosa, com exceção à um animal, todos apresentaram valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira (100 ppb) até este período;

√ Os dados supracitados sobre a aplicação do cloridrato de tetraciclina via intravenosa regional frente à intravenosa sugerem uma vantagem econômica aos produtores de leite e à indústria de laticínios uma vez que o período de carência seria menor para a primeira forma de administração, além de evitar prejuízos ocasionados em virtude de interferência deste antibiótico no processo de produção de derivados.

8. RECOMENDAÇÃO

Recomenda-se o tratamento estatístico dos dados obtidos no experimento considerando as diversas variáveis envolvidas, a fim de estabelecer possíveis conclusões geradas através dos resultados apresentados neste experimento.

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., coords. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.87-92. (Biblioteca Médica).

ALTHAUS, R.L.; TORRES, A.; MONTERO, A.; BALASCH, S. Detection limits of antimicrobials in ewe milk by devoltest photometric measurements. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.86, n.2, p.457-63, 2003.

BAGGOT, D.G.; RUSSEL, A.M. Lameness in cattle. **Br. Vet. J.**, London, v.137, n.1, p.113-132, 1980.

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

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. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.48, n.3, p.519-29, 1987.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Norma Técnica (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

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/comissoes/residuos.html>. Acesso em: 13 mai. 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Inspeção. Centros de Bioequivalência. Legislação. **Resolução n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res\[655-2-0\].html](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res[655-2-0].html). Acesso em: 23 jun. 2003b.

BUTSON, R.J.; SCHRAMME, M.C.; GARLICK, M.H.; DAVIES, J.V. Treatment intrasynovial infection with gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads. **Vet. Rec.**, London, 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. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.55, n.5, p.374-378, 1992.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobial agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001a. cap.43, p.1143-1170.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBERD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001b. cap.47. p.1239-1271.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

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. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.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. **Vet. Rec.**, London, v.8, p.563-567, 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, 1999. p.422-433.

DENOBILE, M. **Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclinas, 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.; SAINT 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). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.206, n.12, p.1923-1927, 1995.

ELMORE, R.G. Food-animal regional anesthesia. 7. Bovine blocks: intravenous limb block. **VM/SAC, Vet. Small Anim. Clin.**, Edwardsville, v.75, n.12, p.1835-1836, 1980.

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

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

FURUSAWA, N. Rapid liquid chromatoraphy determination of oxytetracycline in milk. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.839, p.247-251, 1999.

GAGNON, H.; FERGUSON, J.G.; PAPICH, M.G.; BAILEY, J.V. Single-dose pharmacolinetics of cefazolin in bovine synovial fluid after intravenous regional injection. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.17, p.31-37, 1994.

GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. p.400-404.

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

HAUCK-BAUER, R. Untersuchungen über den therapeutischen Nutzender regionalen intravenösen Verabreichungen von Oxytetrazyklin in die Vv.

Digit. Dors. Comm. III et IV bei Klauenerkrankungen des Rindes. **Vet. Med. Diss.**, Hannover, 1977.

HIRSBRUNNER, G.; STEINER, A. Treatment of infectious arthritis of the radiocarpal joint of cattle with gentamicin-impregnated collagen sponges. **Vet. Rec.**, London, 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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, 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). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.199, n.11, p.1616-22, 1991.

KOFLER, J. Septic arthritis of the pastern in cattle-clinical, radiological and sonographic findings and treatment. **Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.**, Berlin, v.108, n.8, p.281-289, 1995.

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. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.49, n.5, p.650-7, 1988.

LLOYD, K.C.; STOVER, S.M. PASCOE, J.R.; ADAMS, P. Synovial fluid pH, cytologic characteristics, and gentamicin concentration after intra-

articular administration of the drug in an experimental model of infectious arthritis in horses. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.51, p.1363-1369, 1990.

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. **Vet. Q.**, Utrecht, v.15, n.1, p.1-5, 1993.

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. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.6, p.742-756, 1998.

NAVARRE, C.B.; ZHANG, L.; SUNKARA, G.; DURAN, S.H.; KOMPELLA, U.B. Ceftriaxone distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.22, n.1, p.13-19, 1999.

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

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.882, p.109-133, 2000.

- ORSINI, J.A. Strategies for treatment of bone and joint infections in large animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.185, n.10, p.1190-1193, 1983.
- PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclina: relação entre as suas propriedades físico-químicas e a determinação por HPLC. **Rev. Port. Farm.**, Lisboa, v.47, 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 Pharm.**, Granada, v.38, n.1, p.27-37, 1997b.
- SADICK, N.S. Antibiotics: unapproved uses or indications. **Clin. Dermatol.**, New York, v.18, p.11-16, 2000.
- SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.812, p.99-109, 1998.
- SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.85, n.3, p.487-493, 2002.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol e análogos In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999a. p.400-404.

- SPINOSA, H.S. Considerações gerais sobre os antimicrobianos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999b. p.361-366.
- STANEK, C. Basis of the intravenous regional antibiotics in digital surgery in cattle. **Isr. J. Vet. Med.**, Tel Aviv, v.49, n.2, p.53-58, 1994.
- STANEK, C. Septic arthritis of the hoof joint in the horse-diagnosis, radiologic changes and therapy. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.**, Zurich, v.139, n.13, p.134-43, 1997.
- THURMON, J.C.; KO, J.C.H. Anesthesia and chemical restraint. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D., eds. **Lameness in cattle**. 3.ed. Philadelphia, London: W.B. Saunders, 1997. cap.4, p.41-55.
- TIMONEY, J.F. The tetracyclines. In: STEELE, J.H.; JUKES, T.H.; DEPONT, 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.; CASALI, A.K. Drogas antimicrobianas. In: _____. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p.531-552.

TRENT, A.M.; REDIC-KILL, K.A. Clinical pharmacology. In: GREENOUGH, P.R.; WEAVER, A.D., eds. **Lameness in cattle**. 3.ed. Philadelphia, London: 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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.208, n.3, p.404-407, 1996.

WEAVER, A.D. Intravenous local anesthesia of the lower limb in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.160, n.1, 1972.

WHITAKER, D.A.; KELLY, J.M.; SMITH, E.J. Incidence of lameness in dairy cows. **Vet. Rec.**, London, 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., eds. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: ASM Press, 1995. p.1281-1307.