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

**Avaliação de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas
acometidas de dermatite digital papilomatosa tratadas por
aplicação tópica e intramuscular.**

Marcus William Mauricio de Oliveira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientador:
Profª. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento**

**São Paulo
2006**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011689

Ficha Catalográfica

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

O48a Oliveira, Marcus William Mauricio de
Avaliação de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas
acometidas de dermatite digital papilomatosa tratadas por
aplicação tópica e intramuscular / Marcus William Mauricio de
Oliveira. -- São Paulo, 2006.
80p.

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 I. T. II.
Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.

615.954 CDD

Marcus William Mauricio de Oliveira

Avaliação de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas acometidas de dermatite digital papilomatosa tratadas por aplicação tópica e intramuscular.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 11 de Janeiro de 2006.

Dedico este trabalho

À Deus que me deu vida, saúde e
sabedoria para aqui chegar.
À minha família, meus pais Tarciso e
Marly. Por terem feito o possível e o
impossível para possibilitar a minha
chegada até aqui. Por terem me ensinado
com seu exemplo a amar e a trabalhar
muito. Muito Obrigado por Tudo.

À minha amada esposa Roberta

Pelo amor incondicional, pela ajuda
imprescindível na realização deste trabalho, sem
você isto nunca teria se tornado realidade.
À você meu eterno agradecimento e amor.

À Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

Pela paciência, e pelos preciosos ensinamentos
que foram muito mais do que acadêmicos, mas sim
para a vida, o que fará de mim um bom profissional
e mais ainda um ser humano melhor.
Muito Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade;

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelos ensinamentos;

Ao professor Hélio Stefani pelo auxílio, proporcionando recursos para a realização das análises para este trabalho;

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho;

À pessoas como a Profa. Dra. Célia Coli, Profa. Dra. Myrian Clara Salvatori, Dra Cristina Pisaneschi (Chromanalysis) pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho, meu agradecimento.

RESUMO

Oliveira, M.W.O. Avaliação de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas acometidas de dermatite digital papilomatosa tratadas por aplicação tópica e intramuscular. São Paulo, 2006. Dissertação (Mestrado). 80 p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. marcuswo@usp.br.

Orientador: Elizabeth de Souza Nascimento

Palavras-chave: Oxitetraciclina de Longa Ação; Administração Intramuscular; Administrações Múltiplas; Resíduos em Leite.

O presente trabalho visa avaliar a presença de resíduos de oxitetraciclina de longa ação em leite de vacas acometidas de dermatite digital papilomatosa, divididas em dois grupos, tratadas por aplicação tópica e intramuscular, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Desta forma, objetivando determinar a curva de eliminação da oxitetraciclina de longa ação em múltiplas administrações e o período de carência desse antibiótico no leite, foram colhidas amostras biológicas em diferentes tempos após a administração do fármaco.

O método analítico validado apresentou linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão e exatidão adequados, para a quantificação da oxitetraciclina em leite bovino.

Os animais do grupo 2, tratados com a aplicação tópica, não apresentaram resíduos no leite.

No grupo 1, onde os animais foram tratados com aplicação intramuscular, o aumento na concentração do resíduo variou de acordo com a proximidade da coleta com a administração, e foram tão altos quanto 4854ng/ml, e os limites máximos de resíduos, foram superiores a tempo de carência preconizado pelos laboratórios farmacêuticos.

ABSTRACT

Oliveira, M.W.O. Milk oxitetracycline residues evaluation in DDP afflicted cows treated with topic and intramuscular administration. Sao Paulo, 2006. Dissertation (Master Degree). 80 p. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas. Universidade de Sao Paulo. marcuswo@usp.br.

Tutor: Elizabeth de Souza Nascimento

Key-Words: Long Action Oxytetracycline; Intramuscular Administration; Multiple Administration; Milk Residues.

The purpose of this present work is to evaluate the presence of long action oxitetracycline residues in milk from DDP afflicted cows, treated with topic and intramuscular administration (8 animals per group). Analysis were performed by High Performance Liquid Chromatography after treatment with trichloroacetic acid.

Therefore, aiming to determine the long action oxitetracycline elimination curve in milk residues, after multiple administrations, and withdraw period, biological samples were collected in different times after antibiotic administrations.

The validated analytic method showed suitable linearity, quantification limit, accuracy, precision and recovery, for quantification of oxitetracycline in milk.

The group in which oxytetracycline, was administered dermically showed any residues in milk in all analysed samples.

In the first group, where the animals were treated with intramuscular administration, values as high as 4854 ng/ml were detected, and concentration were higher than Maximum Residue Levels after the withdraw period, determined for the pharmaceutical laboratories.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
1.1 Resíduos de antibióticos em alimentos e os riscos a saúde pública.....	09
1.2 Limite Máximo de Resíduo (LMR)	17
1.3 Oxitetraciclina	20
1.3.1 Farmacocinética.....	23
1.3.1.1. Absorção.....	23
1.3.1.2 Distribuição	23
1.3.1.3 Biotransformação e Excreção	24
1.3.2 Farmacodinâmica	25
1.3.3 Efeitos Adversos na Terapia com Tetraciclina.....	26
1.4 Análise Laboratorial de Resíduos de Antibióticos	27
1.4.1 Métodos Cromatográficos na Análise das Tetraciclina.....	28
2. Objetivos	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. Material e Método	35
3.1 Animais e Grupos.....	35
3.2 Procedimentos	38
3.3 Análises Laboratoriais	41
3.3.1 Determinação da Concentração de Oxitetraciclina em Leite.....	41
3.3.1.1 Reagentes	41
3.3.1.2 Equipamentos, acessórios e vidraria.....	42
3.4 Método	43

3.4.1 Condições Cromatográficas	43
3.4.2 Procedimento Analítico – análise de oxitetraciclina em leite	44
3.5 Validação do Método	45
3.5.1 Limite de Quantificação	45
3.5.2 Recuperação	45
3.5.3 Estudo de Linearidade	46
3.5.4 Curva de Calibração	47
3.5.5 Precisão do método analítico	47
3.5.6 Exatidão	47
3.5.7 Estabilidade do analito na amostra	48
3.5.8 Análises das amostras de animais tratados com oxitetraciclina por via dérmica e por via intramuscular	48
4. Resultados	49
4.1 Otimização das condições cromatográficas	49
4.2 Resultados dos parâmetros da validação do método analítico para determinação de oxitetraciclina	50
4.2.1 Limite de Quantificação	50
4.2.2 Recuperação	50
4.2.3 Linearidade	51
4.2.4 Precisão	51
4.2.5 Exatidão	52
4.2.6 Estabilidade	52

4.3 Determinação de oxitetraciclina em amostras de leite de animais tratados com cloridrato de oxitetraciclina em pó e em solução	53
5. Discussão	60
6. Conclusão	66
7. Referências Bibliográficas	67

1. INTRODUÇÃO

As afecções que induzem as claudicações constituem-se em um dos mais importantes problemas que acometem a espécie bovina, sendo superadas somente pelos problemas reprodutivos e pelas infecções na glândula mamária, implicando assim em prejuízos econômicos significativos ao agronegócio (BAGGOTT & RUSSELL, 1980; WHITAKER et al., 1983; NUSS & WEAVER, 1991; STANEK, 1994; DESROCHERS et al., 1995; CLARKSON et al., 1996; GREENOUGH et al., 1997; NAVARRE et al., 1999).

A maioria das claudicações na espécie bovina é originária de doenças podais e apresentam opções de tratamento limitadas, especialmente quando os processos infecciosos atingem ossos e articulações. Os processos infecciosos que acometem os dígitos podem atingir estruturas mais profundas, culminando, por exemplo, com a necrose do tendão flexor digital profundo, osteomielite do sesamóide distal e ou falange distal, artrite interfalangeana distal, tenossinovite do flexor digital profundo, doença da linha branca e flegmão interdigital (STANEK, 1994; DESROCHERS et al., 1995; KOFLER, 1995; CLARKSON et al., 1996; NAVARRE et al., 1999).

Ao analisar as infecções podais devemos considerar as bactérias como etiologia principal. Entre estas se destacam o *Actinomyces pyogenes*, Gram negativa (G-) anaeróbica facultativa, como a mais freqüentemente encontrada, além dos *Streptococcus* spp. Gram Positivo (G+), *Salmonella* spp. (G-), *Escherichia coli* (G-), *Proteus* sp (G-) e *Fusobacterium necrophorum* (G- anaeróbico). Menos freqüentemente as infecções podem ser causadas por *Staphylococcus* spp. (G+), *Erysipelothris* spp. (G+), *Pseudomonas* spp. (G-), *Pasteurella* spp. (G-), *Haemophilus* spp. (G-), *Bacteroides* spp. (G- anaeróbico), *Brucella* spp. (anaeróbico) e *Mycoplasma* spp. São comumente observadas as infecções mistas contendo bactérias aeróbicas G- associadas a anaeróbicas ou G+ aeróbicas (KASARI et al., 1988; TRENT & REDIC-KILL, 1997).

Dentre as diversas enfermidades podais dos bovinos, tem destacado-se a dermatite digital papilomatosa (DDP). Trata-se de uma doença aparentemente contagiosa, dolorosa e circunscrita ao dígito. As lesões iniciais são tipicamente avermelhadas, planas e ulceradas, e posteriormente ampliam suas dimensões, tomando um aspecto verrucoso com projeções papilares (WALKER et al., 1997; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001). A doença foi primeiramente descrita na Itália, por CHELI & MORTELARO

(1974), sendo também reportada em vários países (RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1996a; RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1996b; ARGAEZ-RODRIGUEZ et al., 1997; KOFLER, 1997; RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1998; WELLS et al., 1999; RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1999; BROWN et al., 2000).

Vários nomes têm sido utilizados para descrever a DDP, incluindo dermatite digital, papilomatose interdigital e dermatite verrucosa (WALKER et al., 1995; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001). A lesão determinada pela DDP pode causar claudicação moderada a severa, resultando em diminuição da massa corporal e redução da produção leiteira (WALKER et al., 1995; COULON et al., 1996; BRITT et al., 1999; OHYA et al., 1999; YERUHAM et al., 2000; BERRY, 2001). A redução na ingestão de alimentos, também apresenta como implicações uma diminuição nos sinais de estro e elevação do período compreendido entre o parto e a concepção. Os prejuízos decorrentes da DDP são atribuídos ainda aos custos com o tratamento da enfermidade e a necessidade de descarte do leite de animais em lactação, devido à presença de resíduos de antimicrobianos (BRITT et al., 1999).

As lesões ocorrem freqüentemente nos membros pélvicos e localizam-se na superfície plantar acima do espaço interdigital, adjacente

aos bulbos dos cascos (WALKER et al., 1995; RODRIGUEZ-LAINZ et al., 1996b; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001).

Devido a marcante suscetibilidade das lesões causadas pela DDP, quando da administração tópica ou parenteral de alguns antimicrobianos (BRITT et al., 1996; BRITT et al., 1999; HERNANDEZ et al., 1999; LAVEN & PROVEN, 2000; BERRY, 2001; FAJT & APLEY, 2001) e a detecção de espiroquetas invadindo o estrato espinhoso e papilas dermais, sugere-se que estas bactérias desempenhem um importante papel na patogenia da doença (WALKER et al., 1995; DÖPFER et al., 1997; YERUHAM & PERL, 1998; BRITT et al., 1999; FAJT & APLEY, 2001).

Estudos epidemiológicos admitem que determinadas condições ambientais e de manejo, possam predispor à doença novilhas leiteiras. Citam-se como exemplos destas condições o peso das novilhas, tipo de piso (concreto), introdução de animais no rebanho e casqueamento (CHELI & MORTELLARO, 1974; RODRÍGUEZ-LAINZ et al., 1996a; ARGAEZ-RODRIGUEZ et al., 1997; KOFLER, 1997; WELLS et al., 1999).

Assim, a DDP apresenta-se como uma doença multifatorial, onde as condições de higiene precárias são determinantes e nas quais as

espiroquetas podem estar primariamente envolvidas (GRUND et al., 1995; KOFLER, 1997; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001; FAJT & APLEY, 2001).

Estudos revelaram que a maioria das vacas acometidas de DDP, que receberam administração tópica de penicilina G, procaina, ceftiofur sódico, oxitetraciclina, lincomicina ou uma combinação de lincomicina e espectinomicina, seguida ou não de bandagens, responderam favoravelmente dentro de 7 a 30 dias após o término do tratamento. Entretanto, também foi observada a recorrência das lesões em vacas previamente tratadas com antibióticos (BRITT et al., 1996; COULON & LESCOURRET, 1996; KOFLER, 1997; HERNANDEZ et al., 1999; OHYA et al., 1999; HERNANDEZ & SHEARER, 2000; LAVEN & PROVEN, 2000; FAJT & APLEY, 2001).

As indicações sobre a provável participação das espiroquetas na etiopatogenia da DDP deve-se, entre outros fatores, ao predomínio deste microorganismo nas lesões (WALKER et al., 1995; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001), sendo este encontrado invadindo o estrato espinhoso e papilar dermal. Recentemente, *Campylobacter sputorum* foi isolado a partir

de lesões de vacas acometidas de DDP (DÖPFER et al., 1997; OHYA et al., 1999).

A diferença entre a resposta humoral de vacas acometidas de DDP e sadias, comparadas através do teste ELISA, indica claramente que as espiroquetas induzem uma resposta humoral significativa na maioria das vacas (WALKER et al., 1997). Apesar de a DDP ser amplamente estudada, permanece obscuro o papel das espiroquetas como organismo primariamente envolvido ou oportunista após o desenvolvimento preliminar da lesão (WALKER et al., 1995; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; FAJT & APLEY, 2001).

Os resultados insatisfatórios obtidos no tratamento das doenças podais dos bovinos, através da administração parenteral de antimicrobianos, devem-se em parte a 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 sangüíneo e uma reduzida drenagem venosa e linfática. Assim, as vias de

eliminação do material necrótico são restritas (ORSINI, 1984; TRENT & REDIC-KILL, 1997). Os ligamentos e tendões também apresentam reduzido suprimento sangüíneo, e além disso, possuem uma limitada habilidade para regenerar-se (HONNAS et al., 1991; ANDERSON et al., 1996; TRENT & REDIC-KILL, 1997).

Desta forma, a escolha de um antimicrobiano deve estar baseada na sensibilidade microbiana à substância e também nas suas características farmacocinéticas, devendo esta escolha recair sobre uma substância de amplo espectro de ação e capaz de atingir elevadas concentrações nos diversos tecidos acometidos em uma infecção podal (HONNAS et al., 1991; ORSINI, 1984; FERGUSON, 1997; TRENT & REDIC-KILL, 1997), como por exemplo, o ceftiofur sódico e a oxitetraciclina (MORCK et al., 1998).

O sucesso em todas as técnicas de tratamento depende da concomitante e apropriada terapia antimicrobiana sistêmica (VERSCHOOTEN et al., 1974; BERTONE et al., 1987; BAXTER et al., 1991; HONNAS et al., 1992a; HONNAS et al., 1992b; PEJSA et al., 1993; STANEK, 1994; DESROCHERS et al., 1995; KOFLER, 1995; FERGUSON, 1997; STANEK, 1997; MORCK et al., 1998; NAVARRE et al., 1999).

Devido ao prolongado período de tratamento que pode se estender de

2 (duas) (casos mais simples) a 6 (seis) semanas (infecção disseminada atingindo ossos e articulações), o custo dos medicamentos antimicrobianos, bem como a mão de obra dispensada para sua administração, são tidos como os fatores mais dispendiosos e limitantes no tratamento das afecções dos dígitos (WHITAKER et al., 1983; BAXTER et al., 1991; STANEK, 1994; GREENOUGH et al., 1997; NAVARRE et al., 1999).

Além disso, a terapia antimicrobiana implica na presença de resíduos nos tecidos e leite, resultando na necessidade de se descartar o leite e retardar o descarte do animal quando do insucesso do tratamento nos animais, sendo este intervalo variável dependo do período de carência de cada antimicrobiano (HADDAD et al., 1986a; HADDAD et al., 1986b; BROWN et al., 1986; TYCZKOWSKA et al., 1993; STANEK, 1994; PEDERSOLI et al., 1995; MORCK et al., 1998; CHERLET et al., 2000). Deve-se atentar também para as lesões nos locais de aplicação que induzem a remoção excessiva de retalhos musculares durante o abate dos animais (STANEK, 1994). O que se deve questionar, no entanto, não é somente a presença destes resíduos, mas sim o tipo e as concentrações dos mesmos, devendo estes se encontrar dentro de Limites Máximos de Resíduos (LMRs), dando a estes valores grande margem de segurança, o suficiente para que garanta a segurança do produto de origem animal (PALERMO, 2001).

1.1 Resíduos de antibióticos em alimentos e os riscos a saúde pública

O uso excessivo de antibióticos nas produções animais, bem como a presença de resíduos na cadeia alimentar, pode acarretar riscos à saúde humana e animal (MITCHELL et al, 1998, DENOBILE, 2002).

O uso de antibióticos em concentrações subterapêuticas em animais induz o aparecimento de cepas selecionadas de bactérias, eventualmente resistentes. A multiplicação destas populações resistentes, junto com o potencial de resistência cruzada, leva ao desenvolvimento de colônias bacterianas extremamente resistentes a um amplo espectro de antibióticos. Se tais bactérias resistentes forem transferidas aos humanos através do consumo de alimentos produzidos por estes animais, estas bactérias poderiam, em última análise, colonizar novos hospedeiros ou passar sua resistência aos antibióticos para outras bactérias presentes (BARTON, 1998, BOWER & DAESCHEL, 1999, MANIE et al, 1999, STOBBERINGH & BOGAARD, 2000, DENOBILE, 2002).

De acordo com BOWER & DAESCHEL, 1999 (apud Denobile, 2002), este fato ocorre devido às doses subterapêuticas de antibióticos

rotineiramente adicionados à ração animal, e não devido ao tratamento terapêutico de animais. O FDA aprovou uma variedade de antibióticos para uso em ração animal, incluindo a penicilina em aves e suínos; as tetraciclina em todos os animais produtores de alimentos e as sulfas em suínos. Contudo, doses subterapêuticas destes antibióticos favorecem a seleção de microorganismos resistentes nos animais e esse fator pode não ter sido considerado quando os níveis de tolerância foram estabelecidos para esses compostos em alimentos.

O significado do surgimento de população bacteriana resistente não está limitado somente à saúde do animal usado como alimento, mas também, ao efeito do resíduo de antibióticos no complexo ecossistema microbiano do intestino humano (BOWER & DAESCHEL, 1999). A diversidade de elementos de resistência na microflora humana pode aumentar através da introdução de flora resistente de origem bovina. A literatura atual fornece evidências do surgimento de algumas bactérias patogênicas com resistência múltipla aos antibióticos que poderiam ameaçar a saúde humana (BARTON, 1998, MANIE et al, 1999). Os resíduos de antimicrobianos no leite podem, também, ter um efeito adverso na flora intestinal humana, o que pode prejudicar sua ação protetora local, além de propiciar o aparecimento de uma flora resistente (BRITO, 2001,

HONKANEN-BUZALSKI & REYBROECK, 1997, MITCHELL, 1998).

Em 1984, Scott Holmberg et al (apud DENOBILE, 2002) identificaram, em 18 pessoas, em quatro estados dos EUA, uma infecção causada por uma cepa de *Salmonella newport* resistente, através da ingestão de carne de gado originário do estado de Dakota do Sul. Em 1985, *S. typhimurium*, resistente aos antibióticos, originária da indústria leiteira de Illinois, EUA, infectou 16.000 pessoas em sete estados. Os dados de outros países mostram padrões similares de resistência. Na Europa, em anos anteriores a 1984, observou-se que a *S. dublin* era sensível à ação dos antibióticos. Desde 1984 observa-se que linhagens de bactérias isoladas de gado e de crianças com salmonelose mostram-se resistentes ao cloranfenicol e a estreptomicina.

Em 1985, cerca de mil casos de infecção por *S. newport*, resistente a múltiplos antibióticos foram relatados na cidade de Los Angeles, Califórnia, onde foi caracterizado um plasmídeo idêntico carregando genes de resistência múltipla aos antibióticos em 99% dos isolados de *S. newport*. Foi utilizada uma análise do perfil do plasmídeo para rastrear as bactérias a partir das pessoas doentes, identificando o local de processamento da carne, o abatedouro e finalmente as três fazendas envolvidas no caso (TORTORA,

2000, DENOBILE, 2002).

Alguns ensaios utilizando *Staphylococcus aureus*, como cepa teste, sugerem que combinações de antibióticos em níveis residuais podem causar aumento de resistência. Os resultados de ensaio em colônias de *Staphylococcus aureus* expostas a ampicilina, diidroestreptomicina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina e sulfametazina, individualmente ou em combinação de três medicamentos, indicaram que os chamados “níveis seguros” dos antibióticos/antimicrobianos que podem aparecer no leite apresentam uma forte tendência a selecionar populações de bactérias resistentes (BRADY & KATZ, 1992, BRADY & KATZ, 1993).

BORDAS et al, em 1997, investigaram a relação entre resíduos de praguicidas e antibióticos na seleção de resistências, sendo a unidade de medida a concentração inibitória mínima (CIM), em cepas de *S. aureus* ATCC 9144 sensíveis a antibióticos. Os níveis de resíduos de antibióticos tais como, ampicilina, diidroestreptomicina, eritromicina, neomicina, oxitetraciclina e sulfametazina, e os praguicidas, Malation, Carbaril e Captan, foram todos inferiores aos níveis de tolerância estabelecidos. Os resultados indicaram que estes “níveis seguros” preconizados pelo FDA–CMV (Food and Drug Administration – Center for Veterinary Medicine)

para resíduos de antibióticos em leite e para os três praguicidas normalmente encontrados em alimentos, ou seja, todos em concentrações permitidas, têm potencial, quando seus resíduos estiverem presentes simultaneamente no leite, de aumentar o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos.

Segundo Debackere, 1984 (apud DEBACKERE, 1995), a questão primordial é a de se estabelecer os níveis de resíduos secretados no leite, que tenham influencia no desenvolvimento de cepas resistentes, particularmente no trato intestinal humano. Alguns especialistas não consideram essa questão relevante, por admitirem que tal efeito somente possa ser observado a partir de concentrações maiores ou iguais ao valor da CIM, para a maioria das cepas sensíveis e isto somente é possível em doses terapêuticas.

Em teoria, um outro risco relacionado aos resíduos de antibióticos em leite e seus efeitos antibacterianos é o de causar distúrbios na flora intestinal humana. Embora este problema seja conhecido e debatido há muitas décadas, ainda não existe um consenso. Em um documento intitulado “O risco potencial de efeitos de resíduos antimicrobianos na microflora gastrintestinal humana”, Kidd, 1994 (apud DEBACKERE,

1995) fornece uma revisão excelente e relativamente atual deste risco potencial. Ele chegou as seguintes conclusões:

- 1) a causa mais comum de resistência no homem resulta do uso terapêutico de antimicrobianos na medicina humana;
- 2) a hipótese da ingestão de resíduos afetar o equilíbrio e o padrão da flora intestinal não é comprovada em estudos epidemiológicos, mas também não foi refutada;
- 3) diversas organizações oficiais avaliaram estas hipóteses e cada uma delas concluiu não haver evidências científicas que permitam afirmar que resíduos de antibióticos tenham efeitos na flora intestinal humana;
- 4) Apesar dos efeitos negativos bem documentados relativos à doses terapêuticas, não está bem definida a relação entre os níveis de antibióticos na faixa de ppb a ppm, e a alteração da microflora intestinal e a conseqüente seleção de organismos resistentes.

O autor conclui, baseando-se na literatura consultada, que não há risco potencial de resíduos antimicrobianos sobre a flora intestinal humana.

As reações alérgicas causadas pelo consumo de alimento contendo agentes antimicrobianos parecem ser muito raras. Porém, essa baixa

incidência pode estar relacionada à dificuldade na identificação destas reações. Vickers, em 1964 descreveu reações alérgicas em humanos após o consumo de leite contendo penicilinas. A incidência observada por esse autor foi muito baixa, entretanto, deve-se considerar o fato de que 01 a 10% da população humana pode apresentar reações adversas às penicilinas. (BLACK, 1984). São poucos os casos documentados de reações alérgicas brandas, tais como erupções na pele, em indivíduos previamente sensíveis, devido ao consumo de leite ou carne contendo penicilina G. (SUNDLOF, 1989, MITCHELL et al, 1998)

Embora os níveis aceitáveis de resíduos de antibióticos em leite sejam inferiores ao limite mínimo necessário para produzir reações alérgicas agudas, não se sabe se a exposição freqüente a baixas concentrações de tais antibióticos possa causar efeitos nocivos aos consumidores. A maioria das informações relativas à hipersensibilidade está associada ao uso da penicilina, além de relatos de que aminoclicosídeos, cloranfenicol e novobiocina sejam, também, fortemente alergênicos em indivíduos sensíveis (COLLINS-THOMPSON et al, 1988).

Não existem provas definitivas de que resíduos de antibióticos possam provocar sensibilização e, assim, expor o consumidor ao risco de uma futura reação alérgica ao antibiótico por ocasião de um tratamento

terapêutico. Suspeita-se que os resíduos de penicilina presentes no leite possam induzir reações de sensibilização em indivíduos não alérgicos, porém nada existe que comprove esse fato. A sensibilidade aos antibióticos administrados por via oral só ocorre em doses muito maiores do que as necessárias para induzir o mesmo efeito quando administrados através da via respiratória ou dérmica (SUNDLOF, 1989, DEBACKERE, 1995).

Existem evidências, pelo menos para alguns antibióticos, de que os seus resíduos possam produzir reações alérgicas em pessoas previamente sensibilizadas. A concentração mínima de resíduos necessária para esta ocorrência ainda é discutível. Dependendo da fonte mencionada pode variar de 0,03 e 0,06 a 4,0 e 10,0 UI/ml de leite. Uma vez que a penicilina, compostos similares e alguns metabólitos podem ser alergênicos, é necessário que limites máximos de resíduos sejam estabelecidos para a maioria dos antibióticos (SUNDLOF, 1989, DEBACKERE, 1995).

Restrições especiais existem para o uso dos compostos considerados potencialmente perigosos a saúde humana, como, por exemplo, a proibição da importação e comercialização do cloranfenicol e os nitrofuranos (Anvisa, 2002). O cloranfenicol pode provocar anemia aplástica, um efeito tóxico grave na espécie humana. Os nitrofuranos se mostram

carcinogênicos e mutagênicos em testes de genotoxicidade em animais (SETTEPANI, 1984, SUNDLOF, 1989, MITCHELL et al, 1998).

É importante ressaltar que os produtos de degradação térmica das tetraciclina não causam efeitos adversos e que não foram observadas reações de hipersensibilidade em humanos devido à ingestão de carne e ovos cozidos que originalmente continham resíduos destes compostos (TIMONEY, 1984).

Apesar da dificuldade em definir os riscos dos antibióticos e seus metabólitos a saúde pública, a presença de altas concentrações de resíduos é ilegal e sujeita a multas em muitos países (MITCHELL et al, 1998)

1.2 Limite Máximo de Resíduo (LMR)

O cálculo do LMR é baseado na dose de ingestão diária admissível (IDA) do medicamento. A IDA é a dose diária que se ingerida durante toda a vida do indivíduo, não apresenta riscos apreciáveis à saúde da pessoa que a ingere. Sendo assim, esses valores estão sujeitos a constantes revisões, desde que novos conhecimentos dêem subsídio para essas alterações. A

IDA é expressa em miligramas (mg) do medicamento por quilo (kg) de peso corporal. O LMR para o leite é definido como um décimo daquele definido para a carne, pois se considera que o leite é o principal alimento da dieta de crianças e recém-nascidos, os quais são mais sensíveis que os adultos (Fonseca e Santos, 2001).

Dessa forma os limites máximos permitidos para resíduos de substancias de uso veterinário em alimentos são determinados pelo *Codex Alimentarius*, da FAO (“Food and Agriculture Organization”, da Organização das Nações Unidas – ONU), e da OMS (Organização Mundial da Saúde). Esses limites de fármacos nos alimentos têm importância fundamental por serem pontos de referência para o comércio internacional de alimentos, assim como de estabelecer limites seguros da concentração de resíduos que não apresentam risco à saúde do consumidor (Fonseca & Santos, 2001).

No Brasil, o Ministério da Agricultura através do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), sistematiza os meios de controle da contaminação desses produtos por resíduos de compostos de uso agropecuário, como também os poluentes ambientais. Este programa estabelece como LMR, a quantidade

de 100 ppb para a oxitetraciclina em leite.

Tendo como objetivo a utilização segura dos produtos de origem animal, após a administração de antimicrobianos, são determinados intervalos de tempo para cada substância, onde as concentrações destas estariam acima dos LMR's estabelecidos. A este intervalo dá-se o nome de Período de Carência, sendo sua duração dependente da dose e esquema de tratamento utilizado, via de administração, produção leiteira do animal e formulação do produto. Dentre as indicações e períodos de carência dos principais medicamentos para uso em vacas leiteiras, definidos pela indústria, destaca-se a contra-indicação da administração das tetraciclina (Fonseca & Santos, 2001).

Um estudo conduzido pelo FDA-CVM estabeleceu que o valor de IDA de 25 g/kg de peso corpóreo para resíduos totais de tetraciclina, incluindo a oxitetraciclina, a clortetraciclina e a tetraciclina. Baseado nestes estudos estabeleceu-se um limite de 300 partes por bilhão para a soma de resíduos das tetraciclina no leite. Ficou estabelecida a tolerância individual de 300 ppb para cada uma das três tetraciclina (FDA, 1998).

A partir dos estudos toxicológicos e de efeitos microbiológicos associados a oxite informação sobre a indução de coliformes resistentes no

intestino humano era o *endpoint* mais apropriado na avaliação de risco desse antibiótico. O nível de não efeito observado (NOEL) nos estudos toxicológicos foi de 18mg/kgpc/dia, podendo ser ainda possivelmente maior. A IDA de 0-0.003 mg/ kg pc foi estabelecida baseando-se no nível de não efeito de 2 mg/pessoa/dia, a partir de um estudo em voluntários humanos, considerando-se um fator de segurança de 10. Vale a pena notar que a dose mais próxima testada foi de 20mg/pessoa/dia, de forma que o NOEL mais adequado poderia ser significativamente maior do que o sugerido por este estudo. O valor de segurança selecionado pelo Comitê de Avaliação levou em consideração as variações da flora microbiana intestinal em humanos. Este fator foi considerado conservador, porque os indivíduos selecionados no estudos tinham a flora microbiana sensível a oxitetraciclina. Além disso, o LMR derivado da IDA era semelhante aqueles obtidos *in vitro*, no teste de 50% de concentração inibitória mínima para diversas espécies de microorganismos.

1.3 Oxitetraciclina

As tetraciclina são antibióticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, sendo algumas semi-sintéticas. As tetraciclina (Figura 1), são assim denominadas por sua estrutura química ser formada por quatro anéis.

Esses compostos são eficazes contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de Riquetsias e Clamídias intracelulares (Denobile, 2002, SPINOSA, 1996, TORTORA, 2000).

	R1	R2	R3	R4
COMPOSTO				
Oxitetraciclina	H	CH ₃	OH	OH
Tetraciclina	H	CH ₃	OH	H
Clortetraciclina	Cl	CH ₃	OH	H
Doxiciclina	H	CH ₃	H	OH

Figura 1. Estrutura química das tetraciclinas (DENOBILE, 2002)

As Tetraciclinas (TC) representam uma das mais importantes famílias farmacológicas e, tendo em conta o seu largo espectro de ação antibacteriano, são usadas, como tratamento de primeira escolha, nas infecções bacterianas causadas por *chlamydia*, *rickettsia*, *mycoplasma*,

brucella e *spirochaeteeae*. São ainda frequentemente utilizadas em medicina veterinária, em nutrição animal e em aditivos alimentares destinados a uso pecuário. As tetraciclinas constituem um grupo de substâncias cristalinas de natureza anfotérica, que contêm um esqueleto comum, hidronaftacénico (Figura 1) (Couto, 2000)

De acordo com Denobile, 2002, a primeira tetraciclina foi descoberta por Benjamim Duggar, em 1948, durante em estudo sistemático da atividade antimicrobiana de actinomicetos, presentes no solo, e recebeu o nome de aureomicina, devido à coloração dourada do fungo produtor, o *Streptomyces aureofaciens*, sendo posteriormente denominada Clortetraciclina. Em 1950, Rogna & Solomons isolaram a segunda tetraciclina, a terramicina (alusão feita ao estudo de microorganismos produtores de antibióticos em amostras de solo provenientes de várias partes do mundo), e posteriormente denominada Oxitetraciclina. A elucidação da estrutura química básica destes antibióticos permitiu confirmar as semelhanças entre eles e a obtenção da tetraciclina, em 1953. A partir daí, houve grande interesse em se produzir derivados semi-sintéticos, tais como a doxiciclina e a minociclina, que apresentam a vantagem de uma meia vida mais longa.

1.3.1 Farmacocinética

1.3.1.1 Absorção

A oxitetraciclina é parcialmente absorvida no trato gastrointestinal, sendo que a presença de alimentos no trato digestivo pode prejudicar sua absorção, quando administrada por via oral. Forma quelatos insolúveis com o Cálcio, Magnésio, Ferro e Alumínio. A presença de leite e derivados, as preparações vitamínicas, as preparações férricas, os antiácidos e os catárticos podem reduzir sua absorção. As concentrações plasmáticas de picos de 3 a 5 µg/ml são alcançadas 2 (duas) horas após a administração oral e concentrações plasmáticas de picos de 10 a 20 µg/ml alcançadas após 1 (uma) hora após administração intravenosa. A meia-vida plasmática em mamíferos com função renal normal varia de 07 a 19 horas, dependendo da tetraciclina em questão (TIMONEY, 1984; YAO & MOELLERING, 1995; SPINOSA, 1996; DENOBILE, 2002).

1.3.1.2 Distribuição

Após a utilização oral ou intravenosa do medicamento, as tetraciclina são amplamente distribuídas no organismo e concentram-se no fígado e rins. A minociclina e doxiciclina, por serem mais lipossolúveis,

apresentam melhor penetração no cérebro, líquido espinhal, globo ocular e próstata, do que outras tetraciclina, podendo ser secretadas através do leite. Esses compostos atravessam facilmente a barreira trans-placentária, depositando-se na forma de um complexo tetraciclina-Ca-ortofosfato nas estruturas formadoras dos ossos e dentes, posteriormente, podendo resultar em manchas dentais. A contra indicação mais importante relativa a administração de níveis terapêuticos de tetraciclina durante a gravidez é o aumento do risco de hepatotoxicidade e acidose metabólica (TIMONEY, 1984).

1.3.1.3 Biotransformação e Excreção

De acordo com YAO & MOELLERING, 1995 (apud DENOBILE, 2002) as tetraciclina são biotransformadas pelo fígado e concentradas na bile. Observa-se que essas concentrações biliares são três a cinco vezes maiores que os níveis plasmáticos. Esses medicamentos acumulam-se no sangue de pacientes com insuficiência hepática ou obstrução biliar.

Todas as tetraciclina, exceto a minociclina e a doxiciclina, são excretadas em sua forma ativa através da urina, ou em menor proporção pela bile, sendo a filtração glomerular o processo responsável mecanismo

de excreção renal destes antibióticos (SPINOSA, 1996, DENOBILE, 2002).

1.3.2 Farmacodinâmica

Segundo SPINOSA, 1996, ALTERTHUM, 1999, SADICK, 2000 (apud DENOBILE, 2002) as tetraciclina inibem a síntese protéica dos microorganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomos (nos microorganismos são constituídos de subunidades 30S e 50S, já nos animais superiores são de 40S e 60S). Estes antibióticos ligam-se a subunidade 30S do ribossomo do microorganismo, o que impede que o RNA Transportador (RNAt) se fixe ao ribossomo, não ocorrendo incorporação de aminoácidos, prejudicando a formação da cadeia peptídica. Embora as tetraciclina tenham maior afinidade pela subunidade 30S do ribossomo microbiano, podem se ligar também a subunidade 40S dos animais superiores, o que explica algumas reações adversas advindas do seu uso terapêutico. Portanto, são antibióticos que apresentam efeito bacteriostático no crescimento de microorganismos, onde a síntese protéica é necessária para a produção de nova biomassa, mas também apresentam efeito bactericida contra alguns microorganismos.

1.3.3 Efeitos Adversos na Terapia com Tetraciclina

Dentre os efeitos adversos que podem ser observados após a administração de doses terapêuticas das tetraciclina, estão desordens gastrintestinais, hepatotoxicidade, fotossensibilização, acúmulo em pacientes com insuficiência renal, manchas nos dentes, inibição do hormônio antidiurético, toxicidade vestibular e superinfecção resultante de alterações na flora microbiana bucal, intestinal e vaginal (TIMONEY, 1984).

Quando a dose administrada por via intravenosa é superior a 2g/dia em humanos, pode se observar hepatotoxicidade. Este risco é maior durante a gravidez e em pessoas debilitadas, devido à atividade renal diminuída (TIMONEY, 1984).

As reações de hipersensibilidade são raras, geralmente manifestando-se como urticária, erupções cutâneas e anafilaxia. As reações cruzadas entre as tetraciclina são comuns, e as reações de fotossensibilização consistem de erupções eritematosas nas áreas expostas à luz solar e podem ocorrer com todos os análogos das tetraciclina. A fotossensibilização é observada ocasionalmente e parece ser uma consequência do acúmulo das tetraciclina na pele (YAO & MOELLERING, 1995, DENOBILE, 2002).

As tetraciclina causam depressão do crescimento ósseo, descoloração permanente dos dentes, e hipoplasia do esmalte dos dentes quando administradas durante o desenvolvimento ósseo e dentário. Por isso são contra-indicadas para crianças com idade inferior a oito anos, e durante a gravidez (YAO & MOELLERING, 1995, TORTORA, 2000).

Quando administrados por via oral, as tetraciclina causam irritação de mucosa, provocando manifestações gastrintestinais, tais como náuseas, vômito, diarreia. Podem ocorrer distúrbios da flora intestinal mesmo quando são administradas por via parenteral, uma vez que podem ser eliminadas pelas fezes. A administração por via intramuscular ou subcutânea causa dor no local da injeção. Devido à capacidade de se ligarem ao cálcio, podem provocar efeitos cardiovasculares, tais como disritmias, além da deposição no tecido ósseo e dentário. Podem também causar efeitos tóxicos em células hepáticas, como infiltração gordurosa, e renal com necrose em túbulos proximais.

1.4 Analise Laboratorial de Resíduos de Antibióticos

Os testes comercialmente disponíveis para aplicação em campos são, em sua maioria, qualitativos ou semi-quantitativos e são classificados como testes de triagem (menos sensíveis). Os testes quantitativos (mais sensíveis)

exigem maior perícia técnica e por isso são realizados em laboratórios analíticos como testes de confirmação. (MITCHELL et al, 1998, DENOBILE, 2002)

1.4.1 Métodos Cromatográficos na Análise da Oxitetraciclina

As tetraciclina são quimicamente caracterizadas por uma estrutura de quatro anéis conjugados parcialmente com um grupo funcional carboxiamida (Figura 1). São compostos anfotéricos, 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 tem habilidade de formar complexos fortes com cátions multivalentes. Seus espectros UV mostram forte absorção em torno de 270 e 360 nm em soluções ácidas e neutras (FEDENIUK & SHAND, 1998, OKA et al, 2000).

A identificação e a quantificação dos resíduos de tetraciclina podem ser realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que é a técnica mais comumente utilizada para a determinação de tetraciclina em leite (SCHENCK & CALLERY, 1998). As tetraciclina possuem diferentes grupos funcionais na sua molécula cuja presença torna mais complexos os mecanismos envolvidos na sua retenção nos sistemas cromatográficos.

Como consequência da elevada polaridade das tetraciclina são utilizadas fases móveis com elevado teor aquoso. Em tais sistemas solventes, desempenham papel importante, a formação de pares iônicos, de complexação e a forte interação com grupos silanois residuais. Estes fatores dificultam a quantificação das tetraciclina. (Pena et al, 1997)

As tetraciclina formam quelantes com íons metálicos e tendem a permanecerem adsorvidas nos grupos silanois na coluna de fase reversa. Assim tendem a apresentar picos com caudas e baixa resolução. Estes problemas podem ser superados pela adição de ácido oxálico na fase móvel e pelo uso colunas de poliestirenodivinilbenzeno (OKA et al, 2000, SCHENCK & CALLERY, 1999).

Uma outra forma de evitar a formação destes complexos e sua adsorção nas colunas de fase reversa e fazer uso de fases móveis contendo outros ácidos, como por exemplo, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido perclórico, ácido tartárico (PENA et al, 1997). Entretanto as tetraciclina mostram picos com caudas nas colunas de fase reversa, mesmo usando fases móveis contendo estes ácidos, sendo que o ácido oxálico mostra-se o mais apropriado para evitar esses picos. Assim a fase móvel contendo ácido oxálico aparece em muitos artigos de análises de tetraciclina em alimentos

por HPLC a partir do final da década de 80. (OKA et al, 2000)

A composição da fase móvel, portanto, desempenha um papel muito importante no comportamento cromatográfico das tetraciclinas. Pena et al, em 1997, ao testar diferentes tipos de colunas cromatográficas de fase reversa verificou que não eram necessárias colunas de melhor qualidade e desempenho se fosse escolhida uma fase móvel apropriada. Os melhores resultados foram obtidos em pH 2,0 quer com tampão oxalato, citrato ou fosfato. A adição de ácido oxálico numa concentração adequada atua como um agente complexante muito bom, evitando a formação de picos com caudas e permitindo a determinação precisa das tetraciclinas.

A eficiência pode ser melhorada pela adição de agentes bloqueadores da fase móvel, como é o caso do etilenodiaminatetracetato dissódico (EDTA) que atua como par iônico das tetraciclinas no intervalo de pH entre 3,0 e 5,0. Outros pares iônicos usados incluem: dietanolamina, etanolamina, hepatnosulfonato de sódio, nitrato e compostos de alquilamônio substituídos no sentido de suprimir a formação de complexos entre as tetraciclinas e os íons metálicos, reduzindo significativamente a cauda dos picos cromatográficos (PENA et al, 1997).

Alguns trabalhos como Furusawa, 1999, utilizam colunas de sílica de fase reversa “end-capping”, que é um tipo de coluna submetida a um tratamento com trimetilclorosilano onde ocorre a redução do número de grupos silanol livre, enquanto outros usam sistemas baseados na formação de pares iônicos ou no uso de material de troca iônica. Contudo a eficiência é pouco alterada (PENA et al, 1997).

O uso de colunas poliméricas preenchidas com poliestirenodivinilbenzeno permite uma boa resolução. Porém, segundo White et al, 1993 (apud DENOBILE, 2002), as eficiências dessas colunas e as de fase reversa de tamanho de partículas comparáveis (5 μm) são similares.

Como já foi mencionado, as tetraciclinas apresentam forte absorção UV, em torno de 270 e 360 nm em soluções ácidas e neutras, portanto o método de detecção mais convencional para sua determinação é o HPLC acoplado ao detector UV ou detector de arranjo de diodos (DAD) que permite a análise em diferentes comprimentos de onda simultaneamente. Esses compostos produzem forte fluorescência com íons metálicos ou em condições básicas. Isto permite uma análise altamente sensível das tetraciclinas em HPLC acoplada ao detector de fluorescência,

após a degradação das tetraciclinas em condições alcalinas e a formação de metal quelato (PENA et al, 1997, OKA et al, 2000).

A espectrometria de massa também é utilizada como um método de detecção altamente sensível. Essa técnica permite confirmar os resíduos das tetraciclinas devido ao limite de quantificação e especificidade; portanto um método combinando uma simples e precisa separação com uma espectrometria da massa apropriada ofereceria uma vantagem significativa para a confirmação inequívoca de resíduos das tetraciclinas. Embora a cromatografia líquida acoplada ao detector de espectrômetro de massa (LC-MS) pareça ser a mais adequada para esta proposta, à maioria das condições de cromatografia líquida previamente descritas não podem ser diretamente aplicadas aos sistemas de LC-MS existentes, porque elas utilizam fases móveis contendo compostos não voláteis, tais como o ácido oxálico e ácido cítrico para melhorar a resolução cromatográfica. Essas fases quando usadas em LC-MS causam entupimento da interface e um acréscimo de depósitos na fonte de íons, impedindo que o equipamento seja operado por tempo prolongado (OKA et al, 2000, apud DENOBILE, 2002).

As tetraciclinas formam um complexo quelante com íons metálicos e ligam-se as proteínas, assim, devem-se usar ácidos fortes e agentes desproteinizantes acídicos na extração de amostras biológicas. Existe uma

enorme variedade de técnicas a serem usadas na extração das tetraciclinas.

A maioria utiliza solução aquosa contendo agente quelante para diminuir a tendência das tetraciclinas de ligarem-se aos cátions da matriz. O EDTA, o ácido oxálico e o ácido cítrico são os mais comumente utilizados como agentes quelantes (FEDENIUK & SHAND, 1998)

Na purificação utiliza-se de uma extração em fase sólida (SPE) usando colunas de sílica alquil ligadas, Amberlite XAD-2 e extração quelante. A técnica mais comum para essa extração utiliza colunas C₁₈. Entretanto, estes métodos requerem procedimentos mais elaborados, além de apresentarem baixa recuperação e reprodutibilidade. No sentido de evitar estes problemas preconiza-se um pré-tratamento das colunas C₁₈ com EDTA ou reagente de silanização (OKA et al, 2000, FEDENIUK e SHAND, 1998, CROUBELS et al, 1997)

A capacidade quelante das tetraciclinas é usada numa técnica de purificação que é a cromatografia de afinidade de metal quelato (MCAC), baseado na formação de complexos de cátions com as tetraciclinas. (Oka et al, 2000, FEDENIUK & SHAND, 1998, COOPER et al, 1999, DENOBILE, 2002)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas acometidas de dermatite digital papilomatosa (DDP) e tratadas com Cloridrato de Oxitetraciclina em pó e injetável de longa ação. Comparar a curva de eliminação dos resíduos presentes no leite e estabelecer os períodos de carência do antibiótico após essas duas formas de aplicação.

2.2. Objetivos específicos

- Revalidar o método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para a determinação da oxitetraciclina em leite.
- Analisar os resíduos de oxitetraciclina nas amostras de leite obtidas após aplicação de oxitetraciclina em pó e injetável de longa duração em vacas leiteiras.
- Avaliar as curvas de eliminação obtidas nas duas formas de aplicação nos animais tratados e estabelecer os períodos de carências nas duas formas de aplicação.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais e Grupos

Foram utilizadas 16 vacas em lactação, com idade variando de 3 a 10 anos, pesando entre 400 e 650 kg, apresentando DDP em pelo menos um dos membros pélvicos. Com a finalidade de padronização dos grupos, as vacas eram oriundas de uma única fazenda produtora de leite tipo A e que se encontravam no intervalo de lactação compreendido entre 200 e 365 dias pós-parto. Os animais foram mantidos nas mesmas condições na fazenda, alojados em barracão coberto com piso de cimento. A alimentação constou do fornecimento diário de silagem de milho e sal mineral à vontade, ração comercial e caroço de algodão de acordo com a produção leiteira, divididas em duas porções que foram oferecidas no período matutino e vespertino, e água “*ad libitum*”. As vacas foram rotineiramente ordenhadas duas vezes ao dia e todo o leite produzido no intervalo compreendido entre o início dos tratamentos e 72 horas após seus términos, foi descartado, exceto as amostras armazenadas para avaliação da presença de resíduos de oxitetraciclina.

Este protocolo, na parte que se refere à elaboração e coleta das amostras foi executado pelo médico veterinário Prof. Ass. Dr. Celso Antonio Rodrigues, da Unesp – Júlio de Mesquita Filho, campus Araçatuba. As amostras de plasma e líquido sinovial serão analisadas pela

doutoranda, do programa de Pós graduação em Toxicologia – USP, Cláudia Esteban.

Organograma experimental:

- Exame físico pré-operatório
- Determinação do grau de claudicação (DESROCHERS et al., 2001) pré-tratamento e pós-tratamento
- Contenção
- Identificação fotográfica e classificação da lesão
- Oxitetraciclina tópica e bandagem
- Troca da bandagem a cada 48 horas
- Oxitetraciclina L/A injetável a cada 72 horas
- Colheita de amostras de leite, líquido sinovial e sangue venoso
- Momentos das colheitas:
 - M0: imediatamente anterior à colocação da bandagem ou administração injetável
 - M1: 6 horas após administração
 - M2: 12 horas após administração
 - M3: 24 horas após administração
 - M4: 36 horas após administração
 - M5: 48 horas após administração (troca bandagem)
 - M6: 60 horas após administração

- M7: 72 horas após administração (administração injetável)
- M8: 84 horas após administração
- M9: 96 horas após administração (troca bandagem)
- M10: 108 horas após administração
- M11: 120 horas após administração
- M12: 132 horas após administração
- 13: 144 horas após administração (troca bandagem e administração injetável)
- M14: 156 horas após administração
- M15: 168 horas após administração
- M16: 180 horas após administração
- M17: 192 horas após administração (troca bandagem)
- M18: 204 horas após administração
- M19: 216 horas após administração
- M20: 228 horas após administração
- M21: 240 horas após administração (troca bandagem)
- M22: 252 horas após administração
- M23: 264 horas após administração
- M24: 276 horas após administração*
- M25: 288 horas após administração*
- M26: 300 horas após administração*

- M27: 312 horas após administração*
- M28: 324 horas após administração*
- M29: 336 horas após administração*
- M30: 348 horas após administração*
- M31: 360 horas após administração*
- M32: 372 horas após administração*
- M33: 384 horas após administração*
- M34: 396 horas após administração*
- M35: 408 horas após administração*

*Somente Grupo 1 (11 dias após última administração)

3.2 Procedimentos

No momento que precedeu aos tratamentos, todos os animais foram pesados, identificados e examinados. Foi determinado o grau de claudicação, segundo a classificação de DESROCHERS et al., 2001 que varia de intensidade 0 (ausente) a 4 (decúbito) e as lesões da DDP serão classificadas em leve (1), moderada (2) e severa (3), baseando-se nos sinais e extensão da região comprometida (WALKER et al., 1995; DÖPFER et al., 1997; KOFLER, 1997; YERUHAM & PERL, 1998; OHYA et al., 1999; BERRY, 2001).

Os animais foram contidos em brete tombador hidráulico móvel,

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

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

Os animais do Grupo 2 receberam uma dose inicial de 5 g do produto comercial, contendo 22% de cloridrato de oxitetraciclina, associada à bandagem. A administração do antimicrobiano na forma de pó, sobre as lesões dos animais, foi realizada através de compressas de gaze e ataduras de crepe, sendo estas bandagens trocadas a cada 48 horas, totalizando 6 trocas.

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

O local de colheita de líquido sinovial foi a articulação do tarso do membro acometido nos animais de ambos os grupos. O local da

artrocentese foi previamente submetido à tricotomia, seguida de anti-sepsia com solução de polivinil-pirrolidona-iodo (PVPI) a 10%.

As amostras de leite, líquido sinovial e plasma de cada um dos animais foram colhidas nos momentos (M0) imediatamente antes do tratamento, 06 horas (M1), 12 horas (M2), 24 horas (M3), 36 horas (M4), 48 horas (M5), 60 horas (M6), 72 horas (M7), 84 horas (M8), 96 horas (M9), 108 horas (M10), 120 horas (M11), 132 horas (M12), 144 horas (M13), 156 horas (M14), 168 horas (M15), 180 horas (M16), 192 horas (M17), 204 horas (M18), 216 horas (M19), 228 horas (M20), 240 horas (M21), 252 horas (M22), 264 horas (M23) dos Grupos 1 e 2. As colheitas prosseguiram após 276 horas (M24), 288 horas (M25), 300 horas (M26), 312 horas (M27), 324 horas (M28), 336 horas (M29), 348 horas (M30), 360 horas (M31), 372 horas (M32), 384 horas (M33), 396 horas (M34) e 408 horas (M35) somente nos animais que compõem o Grupo 1.

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

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

Todas as amostras de leite, líquido sinovial e plasma, colhidas, foram acondicionadas em recipientes apropriados para cada tipo de amostra e posteriormente armazenadas à temperatura de -20° C, objetivando o encaminhamento para realização da análise laboratorial.

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

3.3 Análises Laboratoriais

3.3.1 Determinação da Concentração de Oxitetraciclina em leite

3.3.1.1 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 oxitetraciclina, teor 92%
- Água Millipore® (Milli Q – resistividade > 16 megaOhm)

3.3.1.2 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® C8, 60Å°, 4µm (3,9 x 150 mm)
- Balança analítica Sartorius Research – modelo R 200 D
- Agitador de tubos Fanem® - modelo 151/VC
- Ultra-som Thornton®
- Sistema de purificação de água Milli Q – Plus Millipore®
- Conjunto de Filtração a 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 Plástica 1 ml (Plastipack - Becton Dickinson®)

- Unidade Filtrante HV Millex e polietileno com membrana durapore 0,45 μm , 13 mm
- Tubos de centrifuga
- Pipetas automáticas Gilson (volumes: 1-20 μl ; 20-200 μl ; 200-1000 μl e 1000-5000 μl)
- Balões volumétricos (10, 25 e 100)
- Béqueres
- Proveta (1000 ml)

3.4 Método

3.4.1 Condições Cromatográficas

As amostras de leite foram analisadas por cromatografia a líquido de alta pressão, nas seguintes condições:

Coluna Nova-Pak Waters® RP 8, 60 °A, 4 μm (3,9 x 150 mm)

Temperatura do termostato da coluna 35°C

Fluxo da fase móvel: 1,0 ml/min

Comprimento de onda: 363 nm

Tempo de corrida: 4 minutos

Fase Móvel: 80% Solução A (Ácido Oxálico 0,01M; Acetonitrila: Trietilamina (90: 9,9: 0,1); 20% Solução B: Acetonitrila 100%

3.4.2 Procedimento Analítico – análise de oxitetraciclina em leite

Em um tubo de centrifuga foram adicionados 1000 μ l das amostras de leite e 350 μ l da solução de ácido tricloroacético a 80 % em H₂O; agitação em vórtex por 1 minuto; centrifugação a 2500 rpm por 20 min; filtração em filtro com membrana 0,45 μ m, 13 mm; injeção automática de 50 μ l do filtrado no cromatógrafo segundo as condições mencionadas anteriormente.

A quantificação da oxitetraciclina das amostras foi realizada após extração da oxitetraciclina em leite conforme a marcha analítica ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Marcha analítica da determinação de oxitetraciclina em leite.

3.5 Validação do método

A validação do método consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros: limite de quantificação, linearidade, recuperação, precisão inter e intra-ensaio, exatidão e estabilidade. Uma vez que este método já havia sido utilizado em estudos prévios, procurou-se revalidá-lo seguindo o procedimento realizado anteriormente. A seguir, a descrição de como estes parâmetros foram determinados.

3.5.1. Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método, definido como a menor concentração que se pode medir com precisão adequada e com coeficiente de variação menor ou igual a 10%, foi obtido por adição de cada tetraciclina ao leite, em concentrações inferiores a 50ppb. As análises para cada concentração foram realizadas em 10 replicatas, segundo o procedimento descrito em 3.4.2.

3.5.2 Recuperação

A recuperação da oxitetraciclina das amostras de leite, foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo a oxitetraciclina, é submetida ao processo de extração, em relação a

concentração obtida quando a amostra, sem a presença de oxitetraciclina, é submetida ao processo de extração, onde no filtrado final obtido são adicionados os padrões de oxitetraciclina. As análises foram realizadas segundo o procedimento descrito em 3.4.2 nas concentrações 50, 1000 e 5000ng/ml.

A porcentagem de recuperação da oxitetraciclina foi obtida aplicando-se a equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração amostra}}{\text{Conc. branco adicionado}} \times 100$$

3.5.3 Estudo da Linearidade

Para definir o intervalo das concentrações nas quais a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional às concentrações de cada tetraciclina, o estudo da faixa de linearidade do método, foi obtido através da adição às amostras de pool de leite, solução-padrão da oxitetraciclina, para se obter as seguintes concentrações: 50; 100; 500; 1000; 10000; 15000ng /ml. Estas amostras, e amostra branco de leite, foram analisadas em sextuplicata, segundo o procedimento descrito em 3.4.2.

3.5.4 Curva de calibração

Para o preparo das curvas de calibração foi adicionada às amostras de *pool* de leite, solução-padrão da oxitetraciclina, para se obter as seguintes concentrações: 12,5, 25,50, 100 e 500, 1000, 5000, 10000 e 15000ng/ml. Tais amostras, assim como um branco de leite, foram submetidas ao procedimento descrito 3.4.2 e analisadas em dez replicatas. A partir dos resultados dessas análises, as regressões lineares foram obtidas, usando-se então, as equações da reta para o cálculo de oxitetraciclina nas amostras. Esse processo foi realizado para obtenção da curva de calibração em cada lote de amostras.

3.5.5 Precisão do método analítico

Para avaliar a precisão, amostras de leite enriquecidas com três concentrações diferentes: 50, 1000, 5000ppb de oxitetraciclina foram preparadas e em seguida analisadas em dez replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 3.4.2, em um dia para o estabelecimento da precisão intra-dia.

3.5.6 Exatidão

A exatidão é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise (CHASIN *et al*,1998, BRASIL, 2003-b). Para o estudo da exatidão, amostras de leite enriquecidas com três concentrações

diferentes: 50, 1000, 5000 ng/ml de oxitetraciclina foram preparadas e em seguida analisadas em dez replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 3.4.2. A exatidão é avaliada através da inexatidão ou tendenciosidade (bias) e pode ser representada pela equação:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{concentr. Obtida} - \text{concentr. Esperada} \times 100}{\text{concentração esperada}}$$

3.5.7 Estabilidade do analito na amostra

As amostras do *pool* de leite enriquecidas com três concentrações diferentes: 100, 400 e 1200 ng/ml de oxitetraciclina foram preparadas e armazenadas em alíquotas, até serem analisadas segundo o procedimento descrito em 3.4.2. Foi avaliada a estabilidade em *freezer* (-20°C) em período de 3 anos.

3.5.8 Análises das amostras de animais tratados com oxitetraciclina por via dérmica e por via intramuscular

As amostras de animais tratados com oxitetraciclina por via dérmica e por via intramuscular foram analisadas pelo método descrito em 3.4.2.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização das condições cromatográficas

O perfil cromatográfico da oxitetraciclina obtido da análise do pool de leite adicionado encontra-se ilustrado na Figura 4.

Figura 3: Perfil cromatográfico da oxitetraciclina em leite.

Cromatogramas: (A): branco e (B): padrão (10000ng/ml)

4.2. Resultados dos parâmetros da validação do método analítico para determinação de oxitetraciclina.

4.2.1 Limite de quantificação

O limite de quantificação do método para oxitetraciclina foi de 25ng/mL, com coeficiente de variação de 1,61%

4.2.2 Recuperação

Os valores do estudo da recuperação para a oxitetraciclina, estão apresentados na Tabelas 2 onde cada ponto corresponde a média de seis alíquotas.

Tabela 2: Recuperação da oxitetraciclina adicionada ao *pool* de leite, nas concentrações de 50; 1000; 5000ng/ml

Recuperação			
Concentração	Recuperação	DP (%)	CV (%)
50 ng/ml	101,36%	2,34	3,09
1000 ng/ml	108,80%	1,94	1,81
5000 ng/ml	95,80%	6,80	3,59

4.2.3 Linearidade

A Figura 3 ilustra a curva de linearidade da oxitetraciclina, nas concentrações de 50; 100; 500; 1000; 10000; 15000 /ml. Cada ponto corresponde a média dos valores encontrados na análise em dez replicatas.

Figura 3: Curva de linearidade da oxitetraciclina em leite

4.2.4 Precisão

Os coeficientes de variação e desvio padrão obtidos no estudo da precisão intra-dia e interdias para as amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina, nas concentrações de 50, 1000 e 5000ng/ml estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Precisão do método analítico para determinação de oxitetraciclina em leite, expressa pelo coeficiente de variação e desvio padrão.

Precisão		
Concentração	Precisão Intra-Dia	
	D.P.	CV (%)
50 ng/ml	2,34	3,09
1000 ng/ml	1,94	1,81
5000 ng/ml	6,80	3,59

4.2.5 Exatidão

A exatidão do método, sendo representada pela tendenciosidade, ou seja, a inexatidão, verificou-se através da análise em seis replicatas das amostras de leite adicionadas de oxitetraciclina nas concentrações de 50, 1000 e 5000ng/ml e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Inexatidão do método analítico para determinação de oxitetraciclina em leite

Exatidão	
Concentração	Inexatidão
50 ng/ml	1,36%
1000 ng/ml	8,80%
5000 ng/ml	-4,20%

4.2.6 Estabilidade

Os resultados do estudo da estabilidade da oxitetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400ng/ml e 1200ng/ml são ilustrados na

Tabelas 5. As concentrações obtidas referem-se a média da determinação da oxitetraciclina realizada em seis replicatas.

Tabela 5: Análise da estabilidade da oxitetraciclina em leite, nas concentrações de 100 e 400 e 1200ng/ml conservadas em freezer (-20°C)

Estabilidade			
Concentração Esperada	Concentração - T0	Concentração - 62 dias	Concentração - 3 anos
100 ng/ml	113,78 ng/ml	119,74	68,87
400 ng/ml	472 ng/ml	446,23	211,86
1200 ng/ml			1028,41

4.3 Determinação de oxitetraciclina em amostras de leite de animais tratados com cloridrato de oxitetraciclina em pó e em solução.

As amostras de leite foram analisadas segundo o procedimento descrito em 3.4.2, para a determinação de oxitetraciclina, sendo a concentração expressa em ng/ml. A Tabelas 6 apresenta os resultados da determinação de oxitetraciclina em amostras de leite, coletadas de animais tratados com cloridrato de oxitetraciclina em solução e administrados por via intramuscular.

Tabela 6: Resultados das análises de oxitetraciclina do Grupo 1 em ng/ml
(animais tratados com administração Intra-Muscular).

Período de Coleta Grupo 1	Animal 373	Animal 423	Animal 465	Animal 427	Animal 310	Animal 435	Animal 432	Animal 481	Meda (ng/ml)	Desvio Padrão	C.V
M0 (0 h) Adm. Intramuscular	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00		
M1 (06 h)	4395,89	776,98	3191,32	3642,36	779,10	2888,82	1448,04	1895,12	2377,20	1352,81	56,91
M2 (12 h)	6181,58	1555,93	3814,70	3371,59	2367,92	5067,41	1914,23	3174,15	3430,94	1576,93	45,96
M3 (24 h)	5750,37	2529,27	4186,15	3182,75	2037,53	3866,84	3632,85	2188,06	3421,73	1227,14	35,86
M4 (36 h)	3522,97	1519,70	3197,67	2860,92	1710,74	2600,75	3913,94	10619,11	3743,23	2898,57	77,44
M5 (48 h)	1763,92	736,46	2205,68	107,05	1749,14	15444,68	1678,34	868,02	3069,16	5047,49	164,46
M6 (60 h)	1093,58	379,34	1227,66	67,23	1761,94	111,55	1140,68	830,61	826,57	596,85	72,21
M7 (72 h) Adm. Intramuscular	104,67	85,35	1173,31	40,09	770,22	78,42	846,38	63,07	395,19	457,76	115,83
M8 (84 h)	4012,86	2244,35	3573,90	3111,86	3370,78	3600,04	1569,68	3959,91	3180,42	857,16	26,95
M9 (96 h)	4007,72	13148,15	4854,60	2578,35	2011,84	2705,35	3073,33	4872,70	4631,50	3589,46	77,50
M10 (108 h)	3567,68	2798,73	3845,66	977,80	1952,58	1548,09	2730,23	7382,19	3100,37	1984,52	64,01
M11 (120 h)	1627,32	25095,94	2663,98	1234,37	1223,60	572,82	1375,03	678,73	4308,98	8423,72	195,49
M12 (132 h)	943,87	648,08	2809,55	958,60	940,98	473,67	669,99	275,37	965,01	784,48	81,29
M13 (144 h) Adm. Intramuscular	527,75	272,42	941,88	879,55	668,28	90,01	220,84	80,27	460,13	344,28	74,82
M14 (156 h)	5429,80	3659,62	4655,98	2047,22	4359,43	3372,67	2812,70	6205,87	4067,91	1371,40	33,71
M15 (168 h)	7035,44	2681,73	5542,38	1996,92	3937,60	2714,18	2571,14	2444,77	3615,52	1783,98	49,34
M16 (180 h)	5980,53	27123,10	4038,33	1664,37	3317,46	2394,02	2115,95	1953,70	6073,43	8622,61	141,97
M17 (192 h)	2003,28	1545,39	2063,67	424,10	1136,17	1426,41	763,46	949,14	1288,95	580,40	45,03
M18 (204 h)	1252,40	526,85	1789,25	271,32	464,66	881,54	593,15	687,29	808,31	494,46	61,17
M19 (216 h)	476,83	265,43	393,90	107,77	374,52	424,10	246,08	6096,13	1048,09	2043,11	194,94
M20 (228 h)	359,20	94,99	337,12	83,92	284,39	315,48	101,60	542,63	264,91	161,45	60,94
M21 (240 h)	106,90	75,88	336,21	74,71	104,88	100,75	77,73	87,68	120,59	88,11	73,07
M22 (252 h)	68,38	574,44	301,06	71,27	89,96	83,87	55,42	82,92	165,91	183,31	110,49
M23 (264 h)	1409,06	74,92	91,65	68,84	77,09	74,13	41,10	77,78	239,32	472,86	197,58
M24 (276 h)	1145,18	67,28	76,46	3658,81	49,13	57,11	1330,46	48,14	804,07	1271,36	158,12
M25 (288 h)	1008,85	101,50	28508,37	766,61	49,83	76,83	418,51	69,29	3912,47	10065,97	257,28
M26 (300 h)	775,72	9182,79	765,62	563,81	47,19	72,59	90,59	98,33	1449,58	3140,62	216,66
M27 (312 h)	532,55	447,17	771,89	107,53	41,36	72,54	86,20	89,37	268,58	276,78	103,06
M28 (324 h)	516,18	412,60	773,51	89,37	8329,02	8024,63	77,36	78,79	1317,26	2843,91	215,90
M29 (336 h)	329,45	336,48	337,12	86,99	37,18	72,49	77,04	66,45	167,90	138,58	82,54
M30 (348 h)	108,06	94,19	58,73	81,33	30,56	38,03	73,12	59,20	67,90	26,61	39,19
M31 (360 h)	104,57	110,71	27,49	60,58	41,36	33,37	62,32	51,75	61,52	31,00	50,39
M32 (372 h)	102,82	74,71	335,76	53,22	49,07	70,79	51,64	50,57	98,57	97,56	98,98
M33 (384 h)	-	71,27	52,96	19359,69	52,21	74,83	71,01	48,88	2818,69	6825,98	242,17
M34 (396 h)	-	55,13	76,83	49,14	46,13	68,03	89,00	55,66	62,85	26,57	42,28
M35 (408 h)	-	43,00	42,37	21,82	23,89	1600,94	75,56	-	41,33	26,89	65,07

- Inferior ao limite de detecção

Os resultados das amostras dos animais do Grupo 2, ou seja dos animais tratados com oxitetraciclina em pó apresentaram valores inferiores ao limite de detecção.

A Figura 4 ilustra a curva de eliminação média da oxitetraciclina no leite, pelos 8 animais tratados em função do tempo.

Fig. 4. Curva de eliminação no leite da oxitetraciclina (média dos animais analisados) em função do tempo.

As Figuras 5 a 12 ilustram a curva de eliminação da oxitetraciclina no leite, para cada animal administrado por via intramuscular em função do tempo.

Fig. 5. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 373) em função do tempo.

Fig. 6. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 310) em função do tempo.

Fig. 7. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 435) em função do tempo.

Fig. 8. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 432) em função do tempo.

Fig. 9. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 461) em função do tempo.

Fig. 10. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 427) em função do tempo.

Fig. 11. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 465) em função do tempo.

Fig. 12. Curva de eliminação da oxitetraciclina no leite (animal 423) em função do tempo.

5. DISCUSSÃO

A revalidação mostrou que o método é adequado para dosagens de oxitetraciclina no leite. O tempo de retenção de 1,9 minutos é adequado, não havendo interferentes na área próxima a liberação da oxitetraciclina, como pode ser observado na Figura 3. O limite de quantificação da oxitetraciclina é inferior ao limite máximo estabelecido para resíduos, seja pelo FDA como pela legislação Brasileira. As análises de estabilidade mostraram que, em freezer, a oxitetraciclina perde em torno de 40% em 3 anos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas acometidas de dermatite digital papilomatosa (DDP) e tratadas com Cloridrato de Oxitetraciclina em pó e injetável de longa ação. Os resultados obtidos mostraram que, a administração por via dérmica evita que haja resíduo no leite em valores superiores a 12ng/ml que foi o valor mínimo analisado pelo método.

As análises das amostras de leite obtidas de animais tratados em três administrações sucessivas por via intramuscular apresentaram resíduos noquantificáveis até 408h após a aplicação.

Nas fontes de informação consultadas (Pubmed, Web of Sciences, Science Direct, Medline, Biblioteca Virtual em Saúde, Inchem, WHO, IPCS) não foram encontradas referências bibliográficas relacionadas às

procedimento terapêutico é recomendado nas próprias bulas dos medicamentos cujo princípio ativo é a oxitetraciclina de longa ação, como pode ser observado no Compêndio Veterinário, 2002 onde são encontradas as seguintes formulações:

- Oxitetraciclina (Univet S.A) (0,1g/ml)
Bovinos – 1ml para cada 10kg de peso corpóreo a cada 12 horas por via Intra-Muscular (Tratamento 3 – 5 dias ou a critério médico veterinário)
- Oxitetraciclina LA (Bayer S.A)
Intramuscular -20mg/kg pc. Aplicação única
- Oxitrat –LA (Vallée AS) 20g/100ml
Intramuscular - 1ml para 10kgpc (dose única ; infecções graves : segunda dose após 3 a 5 dias)
- Oxitap –LA (Hertape Ltda) 0,2g/ml 1ml por 10kg pc (recomenda-se continuidade do tratamento por 48h após desaparecimento do quadro clínico).
- Oxiplus LA 200 (AgribRANDS do Brasil)
Intramuscular - 0,2mg/ml - 1ml para 10kgpc (permanecendo os sintomas repetir a dose 72h após a aplicação inicial)

De acordo com a Tabela 6, e as Figuras 4 a 12, observa-se que as concentrações no leite aumentam a partir da primeira administração intramuscular e diminuem gradativamente, aumentando novamente após cada administração subsequente. Porém, observa-se que após o decaimento da concentração relativa a terceira injeção, ocorre um aumento considerável de concentração em 5 dos 8 animais tratados, à partir de 264h após a primeira aplicação. Esse tipo de resposta pode estar relacionada a capacidade da oxitetraciclina se ligar ao Cálcio, ou a deposição em glândula mamária e posterior mobilização, além da possível retenção em

adipócitos, por sua capacidade lipofílica. De acordo com Weinstein, 1970 (apud IPCS, 1997) a oxitetraciclina após uma única dose intramuscular produz um aumento no plasma e estas concentrações se mantêm elevadas por até 4 dias.

Em 1998, o Centro de Medicina Veterinária (CVM) reavaliou os dados toxicológicos que fundamentam os limites de tolerância da oxitetraciclina. O efeito adverso na flora intestinal é o *endpoint* apropriado para o estabelecimento de concentrações seguras da oxitetraciclina. Como todas as tetraciclinas tem efeitos microbiológicos similares a tolerância deve ser estabelecida a partir dos efeitos cumulativos na flora intestinal de todas as tetraciclinas. Assim, as concentrações seguras de tetraciclinas totais em relação à atividade microbiológica foi limitada em 1 ppm na dieta total (1,5mg/pessoa/dia). O limite de 1ppm é equivalente a uma IDA de 0,025mg/Kg pc/dia. 60% da IDA é reservada ao leite e 40 % para a ingestão de outros alimentos que possam conter tetraciclinas (como por exemplo, carne de aves, bovinos, ovinos, entre outros). A IDA para leite foi calculada da seguinte forma:

$$\text{IDA para leite} = 0.025 \times 0.60 = 0.015 \text{ mg/kg pc/dia.}$$

Usando-se esta IDA e os padrões de consumo normais de leite a tolerância para as tetraciclinas totais é no leite é calculada da seguinte forma:

$$\text{Tolerância para tetraciclinas totais} = \frac{0.015 \text{ mg/kg pc/dia} \times 60 \text{ kg}}{1.5 \text{ L}} = 0.6 \text{ ppm em 1,5L de leite}$$

No estudo de eliminação de oxitetraciclina em leite realizado por aplicação intramuscular de oxitetraciclina/20mg/kg (Hiles, 1998, apud

FDA) observa-se o perfil de eliminação dos resíduos de oxitetraciclina em leite após uma única injeção intramuscular, apresentado na Tabela 7.

Em 1985, NOUWS, et al estudaram as concentrações de 8 oxitetraciclinas (formulações 10%) administradas em doses de 5mg/kg por via intramuscular. Dessas formulações, 2 foram injetadas intravenosamente visando a obtenção de valores de referencia a serem usados como comparação da farmacocinética. As oito formulações apresentaram valores médios de oxitetraciclina no plasma, nas concentrações que variaram de 2,0 a 4,1 mcg/ml, atingidas entre 4 a 12h após a administração intramuscular, dependendo da formulação. As médias máximas de concentração no leite foram de 0,92 a 1,43 mcg/ml, no período de 12 a 24h após a administração. O perfil concentração-tempo de eliminação no leite foi semelhante, ou correu em paralelo ao do plasma. Após a administração intravenosa o tempo de aparecimento no leite foi de 1 a 2 h, e o pico de concentração foi superior a 1,7-1,9 mcg/ml e foi atingido num tempo menor, entre 6 a 8h, com persistência menor do que a observada na administração intramuscular.

Em 1986, Mervius, et al, avaliaram as concentrações de oxitetraciclina no plasma e no leite de vacas leiteiras, após uma única administração de 10mg/kg de formulações desse antibiótico (20% da formulação). Os picos máximos da oxitetraciclina no plasma foram de 4,5 a 6,8 mcg/ml e foram atingidos entre 5 a 10h após a administração. As concentrações médias máximas variaram de 1.2 a 1,92mcg/ml e foram atingidas 12 a 24h após aplicação. A concentração no plasma acima de 0,5mcg/ml foram mantidas por 48 até 70h e no leite das 33 até 49h. Considerou-se, neste trabalho, que o período de carência encontrava-se na faixa de 3 a 4 dias.

Tabela 7. Média de resíduos of oxitetraciclina em leite após administração única intramuscular de 20 mg/kg pc em gado leiteiro

Tempo (horas pos-tratamento)	Média de resíduos no leite (mcg/ml $\pm$ DP)	Número de animais
0*	<0.15	
11	1,630 $\pm$ 0,525	20**
24	1,680 $\pm$ 0,353	20
35	1,220 $\pm$ 0,1542	20
48	0,824 $\pm$ 0,1728	20
59	0,572 $\pm$ 0,1462	20
72	0,354 $\pm$ 0,0975	20
83	0,234 $\pm$ 0,0712	20
96	0,216 $\pm$ 0,0541	13
107	0,198 $\pm$ 0,0330	4
120	0,155 $\pm$ 0,0071	2
131	-	
144	-	

*amostras coletadas antes da injeção de oxitetraciclina

** No. de animais

Os valores de oxitetraciclina no leite decaem e após 131h não são mais detectados. Nos resultados obtidos no presente trabalho ocorre o mesmo decaimento, porém como há uma segunda aplicação em 72 h os valores são novamente elevados.

Recomenda-se o descarte do leite de animais tratados com oxitetraciclina até 96h após a administração, porém nos resultados obtidos, os animais 465, 310, e 432 apresentaram valores superiores ao limite de tolerância estabelecido pela legislação brasileira.

Este período de carência de 96 h baseia-se em análises estatísticas de depleção, usando o limite superior de tolerância de 99 % da população com 95 % de limite de confiança. A designação de um tempo de carência de 96h, assegura que os resíduos de oxitetraciclina serão inferiores a 300ppb, limite permitido pela legislação americana.

Períodos de carência são estabelecidos em ensaios de administração única, porém se a oxitetraciclina for utilizada em injeções múltiplas os resíduos em leite superarão os LMR e o período de carência estabelecido.

6. CONCLUSÃO

- O método revalidado para determinação da oxitetraciclina em leite, após desproteinização com ácido tricloroacético e quantificação por cromatografia líquida de alta resolução apresentou limite de quantificação, e recuperação precisão, exatidão, linearidade, adequados.
- As administrações sucessivas de oxitetraciclina por via intramuscular apresentaram resíduos em leite em tempo superior ao limites de carência preconizado nas bulas dos medicamentos.
- As análises de oxitetraciclina em leite dos animais tratados por via dérmica não apresentaram resíduos no leite, á partir do método cujo limite de quantificação é de detecção é de 25 ppb.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ANDERSON, D.E., ST-JEAN, G., MORIN, D.E., DUCHARME, N.G., NELSON, D.R., DESROCHERS, A. Traumatic flexor tendon injuries in 27 cattle. *Veterinary Surgery*. v. 25, p. 320-26, 1996.
- ANDREI E. Compêndio veterinário. Dicionário brasileiro de medicamentos veterinários. Andrei Editora. 32^a. Ed. 2002, p.
- ARGAEZ-RODRIGUEZ, F.J.; HIRD, D.W.; HERNANDEZ DE ANDA, J. et al. Papillomatous digital dermatitis on a commercial dairy farm in Mexicali, Mexico: incidence and effect on reproduction and milk production. *Prev Vet Med*. v.32, p.275-286, 1997.
- BAGGOT, D.G., RUSSEL, A.M. Lameness in cattle. *British Veterinary Journal*, v.137, n.1, p. 113-132, 1980.
- BAXTER, G.M., LAKRITZ, J., WALLACE, C.E., BROOME, T.A., PARKS, A.H. Alternative to digit amputation in cattle. *The Compendium*. v. 13, n. 6, p. 1022-35, 1991.
- BERRY, L.S. Disease of the digital soft tissues. *Vet Clin North Am*. v.17, p.129-142, 2001.
- BERTONE, A.L., McILWRAITH, C.W., JONES, R.L., NORRDIN, R.W., BLACK, W.D. The use of antimicrobial drugs in agriculture. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, v62, p.1044-148, 1984.
- BRADY, M.S., KATZ, S.E. In vitro effect of multiple antibiotic/antimicrobial residues on the selection for resistance in bacteria. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.75, n.4, p.738-742, 1992.

BRADY, M.S., WHITE, N., KATZ, S.E. Resistance development potencial of antibiotic/antimicrobial residue levels designated as “safe level”. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.56, n.3, p.229-233, 1993.

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: 23/9/2004

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:

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

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

BROWN, C.C.; KILGO, P.D.; JACOBSEN, K.L. Prevalence of papillomatous digital dermatitis among culled adult cattle in the southeastern United States. *Am J Vet Res.* v.61, p.928-930, 2000.

- BROWN, S. A., COPPOC, G. L., RIVIERE, J. E. Effects of dose and duration of therapy on gentamicin tissue residues in sheep. *American Journal of Veterinary Research*. v.47, n.11, p.2373-2379, 1986.
- 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.
- 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.
- CHELI, R.; MORTELLARO, C.M. La dermatite digitale del bovino, in *Proceedings. VIII Int Cong Dis Cattle*, 1974, p.208-213.
- CHERLET, M., BAERE, S.D., BACKER, P.D. Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. v.35, n.11, p.1342-50, 2000.
- CINQUINA, A.L.; LONGO, F.; ANASTASI, G.; GIANNETTI, L.; COZZANI, R. Validation of a high-performance liquid chromatography

- method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *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. *Veterinary Record*. v. 8, p. 563-567, 1996.
- COULON, J.B.; LESCOURET, F.; FONTY, A. Effect of foot lesions on milk production by dairy cows. *J Dairy Sci*. v.79, p.44-49, 1996.
- COUTO, C. M. C. M., MONTENEGRO M. C. B. S. M., REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião Cobre (ii). Estudo potenciométrico. *Química Nova*, v. 23, n.4, p. 457-460, 2000.
- DENOBILO, M.; Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Universidade de São Paulo*, São Paulo, 2002.
- DESROCHERS, A., ANDERSON, D.E., ST-JEAN, G. Lameness examination in cattle. *Vet Clin North Am*. v.17, p.39-51, 2001.
- DESROCHERS, A., ST-JEAN, G., ANDERSON, D.E. Use of facilitated ankylosis in the treatment of septic arthritis of the distal interphalangeal joint in cattle: 12 cases (1987-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.206, n.12, p.1923-7, 1995.
- DÖPFER D. et al. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with especial reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Vet Rec*. v.140, p.620-623, 1997.
- ERSKINE, R. J., P. C. BARTLETT, P. C. CRAWSHAW, AND D. M. GOMBAS. Efficacy of intramuscular oxytetracycline as a dry cow

- treatment for *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* v. 77, p.3347–3353. 1994.
- FAJT, V.R.; APLEY, M.D. Antimicrobial issues in bovine lameness. *Vet Clin North Am.* v.17, p.159-174, 2001.
- FDA. U. S. Food and Drug Administration. Guidance for industry – Bioanalytical methods validation for human studies Disponível em: <http://www.fda.gov> Acesso em: 01/05/2005
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Tolerances established for tetracycline in milk. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/mi-98-7.html>. Acesso em:
- 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. *Lameness in Cattle*, 3^a ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, Chapter 16, p. 248-261.
- GAGNON, H., FERGUSON, J.G., PAPICH, M.G., BAILEY, J.V. Single-dose pharmacokinetics of cefazolin in bovine synovial fluid after intravenous regional injection. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics.* v. 17, p. 31-7, 1994.
- GÓRNIK, 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: GREENOUGH, P.R., WEAVER, A.D. *Lameness in Cattle*, 3^a ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, Chapter 1, p. 3-13.
- GRUND, S.; NATTERMANN, H.; HORSCH, F. Zum elektronenmikroskopischen Spirochäten-Nachweis bei der Dermatitis

- digitalis des Rindes. *J Vet Med B.* v.42, p.533-542, 1995.
- HADDAD, N.S., PEDERSOLI, W.M., CARSON, R.L.Jr., RAVIS, W.R.
Concentrations of gentamicin in serum, milk, urine, endometrium, and skeletal muscle of cows after repeated intrauterine injections. *Am J Vet Res.* v.47, n. 7, p.1597-1601, 1986b.
- HADDAD, N.S., RAVIS, W.R., PEDERSOLI, W.M., CARSON, R.L.Jr.
Pharmacokinetics of single doses of gentamicin given by intravenous and intramuscular routes to lactating cows. *Am J Vet Res.* v.47, n.4, p.808-13, 1986a.
- HAUCK-BAUER, R. Untersuchungen über den therapeutischen Nutzen der regionalen intravenösen Verabreichung von Oxytetracyclin in die Vv. digit. dors. comm. III et IV bei Klauenerkrankungen des Rindes. *Vet. Med. Diss.*, Hannover, 1977.
- HERNANDEZ, J.; SHEARER, J.K. Efficacy of oxytetracycline for treatment of papillomatous digital dermatitis lesions on various anatomic locations in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* v.216, p.1288-1290, 2000.
- HERNANDEZ, J.; SHEARER, J.K.; ELLIOTT, J.B. Comparison of topical application of oxytetracycline and four nonantibiotic solutions for treatment of papillomatous digital dermatitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* v.214, p.688-690, 1999.
- HONKANEN-BUZALSKI, T., REYBROECK, W. Antimicrobials In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Monography on residues and contaminants in milk and milk products. Brussels: IDF, 1997. p.26-34. (International Dairy Federation, Special Issue 9701).
- HONNAS, C.M., SCHUMACHER, J. KUESIS, B.S. Ankylosis of the distal interphalangeal joint in a horse after septic arthritis and septic

navicular bursitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.200, n.7, p.964-8, 1992b.

HONNAS, C.M., SCHUMACHER, J., COHEN, N.D., WATKINS, J.P., TAYLOR, T.S. Septic tenosynovitis in horse: 25 cases (1983-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.199, n.11, p.1616-22, 1991.

HONNAS, C.M., WELCH, R.D., FORD, T.S., VACEK, J.R., WATKINS, J.P. Septic arthritis of the distal interphalangeal joint in 12 horses. *Veterinary Surgery*. v.21, n.4, p.261-8, 1992a.

<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.html> Acesso em: 13 mai. 2003a.

[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

KASARI, T.R., MARQUIS, H., SCANLAN, C.M. Septic arthritis and osteomyelitis in a bovine digit: a mixed infection of *Actinomyces pyogenes* and *Fusobacterium necrophorum*. *Cornell Veterinarian*. v.78, n.3, p.215-9, 1988.

KOFLER, J. dermatitis digitalis („Mortellaro disease“) in einem Milchviehbestand in Niederösterreich. *Wien Tierärztl Mschr*. v.84, p.254-265, 1997.

KOFLER, J. Septic arthritis of the pastern in cattle--clinical, radiological and sonographic findings and treatment. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. v.108, n.8, p.281-9, 1995.

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

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.
- 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.
- MEIJER, L.A.; CEYSSSENS, 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.
- MEVIUS DJ, NOUWS JF, BREUKINK HJ, VREE TB, DRIESSENS F, VERKAIK R. Comparative pharmacokinetics, bioavailability and renal clearance of five parenteral oxytetracycline-20% formulations in dairy cows. *Vet Q.* v. 8, n.4, p.285-94, 1986.
- MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobials 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.
- MORCK, D.W., OLSON, M.E., LOUIE, T.J., KOPPE, A., QUINN, B. Comparison of ceftiofur sodium and oxytetracycline for treatment of acute interdigital phlegmon (foot rot) in feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v.212, n.2, p.254-7, 1998.
- NAVARRE, C.B., ZHANG, L., SUNKARA, G., DURAN, S.H., KOMPELLA, U.B. Ceftiofur distribution in plasma and joint fluid following regional limb injection in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics.* v.22, n.1, p.13-9, 1999.

- NOUWS JF, BREUKINK HJ, BINKHORST GJ, LOHUIS J, VAN LITH P, MEVIUS DJ, VREE TB. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of eight parenteral oxytetracycline-10% formulations in dairy cows. *Vet Q.* v.7, n.4, p.306-14, 1985.
- NUSS, K., WEAVER, M.P. Resection of the distal interphalangeal joint in cattle: an alternative to amputation. *Veterinary Record.* v.128, n.23, p.540-3, 1991.
- OHYA, T. et al. Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. *Vet Rec.* v.145, p.316-318, 1999;.
- 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.; MOAT, PJ.; ENGILES, J.; NORMAN, T.; POPPENG, R.; BENSON, C.E.; BOSTON, R.C. Cefotaxime kinetics in plasma and synovial fluid following intravenous administration in horses. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* v.27, p. 293-298, 2004.
- ORSINI, J.A. Strategies for treatment of bone and joint infections in large animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v. 185, n. 10, p. 1190-93, 1984.
- OWENS, T.S.; DODDS, H.; FRICKE, K.; HANNA, S.K.; CREWS, K.R. High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of irinotecan and three metabolites in human plasma. *J. Chromatogr., B, Amsterdam*, v.788, p.65-74, 2002.
- PALERMO-NETO, J. Resíduos de antimicrobianos em alimentos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária.* v. 7, n. 22, p. 65-71, 2001.

- PEDERSOLI, W.M., JACKSON, J., FROBISH, R.A. Depletion of gentamicin in the milk of Holstein cows after single and repeated intramammary and parenteral treatments. *J Vet Pharmacol Ther.* v.18, n.6, p.457-63, 1995.
- PEJSA, T.G., ST JEAN, G., HOFFSIS, G.F., MUSSER, J.M. Digit amputation in cattle: 85 cases (1971-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association.* v.202, n.6, p.981-4, 1993.
- PENA, A.; LINO, C.M.; SILVEIRA, I.N. Tetraciclinas: 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.
- RADIN, M.J., LEBEL, J.L. Comparison of various treatments for experimentally induced equine infectious arthritis. *American Journal of Veterinary Research.* v.48, n.3, p.519-29, 1987.
- RODRIGUES, A.R.; Comparação entre as concentrações de tetraciclina no plasma, líquido sinovial e leite de vacas acometidas de dermatite digital papilomatosa, submetidas à administração intravenosa e intravenosa regional. FMV-UESP, Botucatu, São Paulo, 2003
- RODRÍGUEZ-LAINZ, A.; HIRD, D.W.; CARPENTER, T.E., et al. Case-control study of papillomatous digital dermatitis in southern California dairy farms. *Prev Vet Med.* v.28, p.117-131, 1996a.
- RODRIGUEZ-LAINZ, A.; HIRD, D.W.; WALKER, R.L. et al. Papillomatous digital dermatitis in 458 dairies. *J Am Vet Med Assoc.* v.209, p.1464-1467, 1996b.
- RODRIGUEZ-LAINZ, A.; MELENDEZ-RETAMAL, P.; HIRD, D.W. et al. Farm- and host-level risk factors for papillomatous digital dermatitis

- in Chilean dairy cattle. *Prev Vet Med.* v.42, p.87-97, 1999.
- RODRIGUEZ-LAINZ, A.; MELENDEZ-RETAMAL, P.; HIRD, D.W. et al. Papillomatous digital dermatitis in Chilean dairies and evaluation of a screening method. *Prev Vet Med.* v.37, p.197-207, 1998.
- 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.
- SOBACK, S., ZIV G., WINKLER M., SARAN, A. Systemic dry cows therapy: A preliminary report. *J. Dairy Sci.* v.73, p.661-666, 1990.
- SOTTOFATTORI, E.; ANZALDI, M.; OTTONELLO, L. HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *J. Pharm. Biochem. An.*, v.24, p.1143-1146, 2001.
- SPINOSA, H.S. Antibióticos: tetraciclinas, 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 intravenous regional antibiotics in digital surgery in cattle. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* v. 49, n. 2, p. 53-58, 1994.

- STANEK, C. Septic arthritis of the hoof joint in the horse--diagnosis, radiologic changes and therapy. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*. v.139, n.3, p.134-43, 1997.
- STANEK, C., KRIEGEL, A., AWAD-MASALMEH, M., KNEZEVIC P. Blood serum and milk serum levels of sodium benzylpenicillin after intravenous regional antibiotics in surgery of the claw area in cattle. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. v.107, n.8, p.266-71, 1994.
- STANEK, CH., FESSL, L. Zum Einfluß der intravenösen Staunungsanästhesie und -antibiose auf den Gewebe-ph na der Rinderextremität. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* v.92, p.89-90, 1985.
- STANEK, CH., FESSL, L., AWAD-MASALMEH, M. Penicillin-und Ampicillinspiegel in pathologisch veränderten Geweben nach intravenöser Stauungsantibiose an der Rinderextremität. *Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr.* v.97, p.162-166, 1984.
- STEINER, A., OSSENT, P. AND MATHIS, G.A. Di eintravenöse Staunungsanästhesie-antibiose beim Rind-Indikationen, Technik, Komplikationen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* v.132, n.5, p.227-237, 1990.
- 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. *Lameness in Cattle*, 3^a ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, Chapter 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.
- TYCZKOWSKA, K.L., VOYKSNER, R.D., ANDERSON, K.L., ARONSON, A.L. Determination of ceftiofur and its metabolite desfuroylceftiofur in bovine serum and milk by ion-paired liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. v.614, n.1, p.123-34, 1993.
- VERSCHOOTEN, F., De MOOR, A., STEENHAUT, M., DESMET, P., WOUTERS, L., De LEY, G. Surgical and conservative treatment of infectious arthritis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.165, n.3, p.271-5, 1974.
- WALKER, R.L. et al. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Vet Microbiol*.v. 47, p.343-355, 1995.
- WALKER, R.L.; READ, D.H.; LORETZ, K.J. et al. Humoral response of dairy cattle to spirochetes isolated from papillomatous digital dermatitis lesions. *Am J Vet Res*. v.58, p.744-748, 1997.
- WEAVER, A.D. Intravenous local anesthesia of the lower limb in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.160, n.1, 1972.
- WELLS, S.J.; GARBER, L.P.; WAGNER, B.A. Papillomatous digital dermatitis and associated risk factors in US dairy herds. *Prev Vet Med*. v.38, p.11-24, 1999.

- WHITAKER, D.A., KELLY, J.M., SMITH, E.J. Incidence of lameness in dairy cows. *Veterinary Record*. v.113, p.60-62, 1983.
- YERUHAM, I.; PERL, S. Clinical aspects of an outbreak of papillomatous digital dermatitis in a dairy cattle herd. *J S Afr Vet Assoc*. v.69, p.112-115, 1998.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 930.