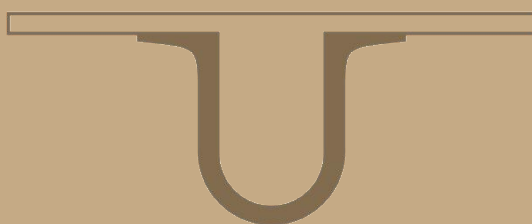




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Daniela da Silva Magalhães

**MULTIDETEÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM
FÍGADO DE LEITÃO PROVENIENTE DA REGIÃO DA
BAIRRADA**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo
Professor Doutor Fernando Jorge Ramos e pela Doutora Andreia Freitas apresentada
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019



Daniela da Silva Magalhães

**Multidetecção de Resíduos de Antibióticos em
Fígado de Leitão proveniente da Região da
Bairrada**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge Ramos e pela Doutora Andreia Freitas apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para
obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar

O estudo apresentado nesta dissertação foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária no Polo de Vairão, sob orientação do Professor Doutor Fernando Jorge Ramos e da Doutora Andreia Freitas.



Agradecimentos

Esta Dissertação de Mestrado é fruto de muito trabalho, sacrifício, dedicação, muita aprendizagem e conhecimento. Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a concluir mais uma etapa académica da melhor maneira, às quais presto aqui o meu sincero obrigada.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor Fernando Ramos, por estar sempre presente em todos os momentos da minha carreira académica, demonstrando sempre disponibilidade para ajudar em tudo. Por se apresentar sempre prestável quando lhe pedi o seu parecer acerca de um bom laboratório para realizar o estágio de final de curso e até mesmo quando quis ir de Erasmus. Um sincero obrigada por todas as oportunidades que me foi proporcionando ao longo destes dois anos de Mestrado.

À Doutora Andreia Freitas, pelo apoio incondicional e por toda a dedicação que teve comigo ao longo dos 5 meses de estágio no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária. Pelos seus ensinamentos ao longo de toda a parte experimental, ensinando-me novas técnicas e métodos de trabalho imprescindíveis para a realização deste trabalho, transmitindo-me valores e conhecimentos fundamentais para concluir esta etapa com sucesso.

A todas as pessoas com quem partilhei conhecimentos ao longo deste percurso no INIAV, obrigada à Salete, Margarida, Filomena e Elsa. Em especial gostaria de agradecer à Dr^a Ana Sofia Vila Pouca, por toda a simpatia, por me animar todos os dias, fazendo me sentir acolhida e integrada no laboratório.

O meu sincero obrigada aqueles que estão a meu lado desde sempre, que nunca me negaram nada, facilitando-me sempre tudo e ajudando-me sempre no que podiam. Aos meus pais Paula Silva e João Magalhães e aos meus avós Glória e João pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer a todos os meus colegas e amigos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação. Em especial, gostaria de agradecer à minha amiga e colega de casa Mariana Barbosa, pelo apoio inigualável e pela motivação que me deu ao longo do meu percurso académico. Por se mostrar incansável para me ajudar em tudo, tanto a nível pessoal como profissional, por me fazer acreditar nos meus valores e nunca me fazer desistir dos meus sonhos.

A todos vós, o meu incondicional, Obrigada!

Resumo

As quantidades totais de carne consumidas, conforme a Balança Alimentar Portuguesa (BAP), relativamente ao grupo de suínos atingiram os 45,2 kilos por habitante por ano, correspondendo a 39% do total de carnes consumidas no ano de 2016, destacando-se também as miudezas, nomeadamente o fígado, sendo consumidas 5,3 kilos por habitante nesse mesmo ano. Para satisfazer esta quantidade de consumo de carne por ano, por habitante, os produtores têm vindo cada vez mais a adotar a técnica do uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais para consumo alimentar. Este uso indevido de antibióticos é considerado fraudulento na Europa, pois pode levar à presença de resíduos destes compostos em matrizes comestíveis. Assim sendo o consumo de alimentos de origem animal contendo resíduos de antibióticos pode originar efeitos tóxicos diretos nos consumidores, como reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis, ou efeitos indiretos, como indução do desenvolvimento de bactérias resistentes, sendo esta uma enorme preocupação mundial. Torna-se assim de extrema importância para a saúde pública, bem como para a segurança alimentar, determinar os possíveis antibióticos que possam estar presentes em animais para consumo alimentar, nomeadamente em leitão. A matriz estudada neste trabalho foi o fígado de leitão, a qual apresentou alguns obstáculos, devido à complexidade associada aos seus elevados teores de proteína e gordura, com a capacidade de interferir no desempenho analítico.

Neste estudo, foram analisadas 36 amostras de fígado de leitão, proveniente da Bairrada, tendo-se recorrido a UHPLC-ToF-MS (Cromatografia líquida de ultra elevada resolução acoplado a espectrómetro de massa em tempo de voo) capaz de detetar, identificar e quantificar a presença de 45 antibióticos pertencentes a 7 classes diferentes. Os métodos analíticos desenvolvidos e otimizados foram validados de acordo com a Decisão da Comissão 657/2002/CE.

Na primeira colheita de quinze amostras, efetuada em novembro de 2018, verificou-se que todas as amostras continham resíduos de antibióticos, enquanto que na colheita referente a fevereiro de 2019, foram encontrados cerca de 47% de resíduos de antibióticos nas 21 amostras analisadas.

Os antibióticos encontrados nas 36 amostras analisadas foram, predominantemente, Enrofloxacina, Danofloxacina e Tilmicosina. Todos esses antibióticos foram encontrados em concentrações mínimas, não excedendo o limite máximo de resíduos (LMR) estipulado pelo Regulamento nº37/2010 da Comissão Europeia, pelo que se pode considerar que não

constituem um risco para o consumidor, embora a presença simultânea de dois ou mais antibióticos na mesma amostra possa levantar questões adicionais de segurança.

Palavras-chave: Antibióticos, Detecção de Resíduos, Fígado de Leitão, Segurança Alimentar, UHPLC-ToF-MS.

Abstract

According to the Portuguese Food Balance (BAP) the total quantity of meat consumed, regarding the group of pigs, reached 45.2 kilos per inhabitant per year, corresponding to 39% of the total meat consumed in 2016. Stressing the offal, mainly the liver, it was consumed 5.3 kilos per inhabitant that same year. Furthermore, to satisfy this amount of meat consumption per inhabitant, per year, producers are increasingly adopting the technique of using antibiotics as growth promoters in animals for food consumption. The antibiotics' misuse is considered fraudulent in Europe as it may lead to the presence of compounds' residues in edible matrices. In this way, the consumption of animal foods containing antibiotic residues can lead to direct toxic effects on consumers, such as allergic reactions in hypersensitive individuals, or indirect effects, such as inducing the development of resistant bacteria, which is a huge worldwide concern. It is of utmost importance for public health as well as consumer food safety to determine the possible antibiotics that may be present in food-producing animals, particularly piglets. The studied matrix in this work was the piglet liver, which presented some obstacles, due to the complexity associated with high levels of protein and fat content, interfering with its analytical performance.

In this study, 36 liver piglet samples from Bairrada were analyzed using UHPLC-ToF-MS (Ultra High Resolution Liquid Chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometer) capable of detecting, identifying and quantifying the presence of 45 antibiotics belonging to 7 different classes. The analytical methods developed and optimized have been validated according to Commission Decision 657/2002/EC.

In the first collection of fifteen samples, carried out in November 2008, it was found that all samples contained antibiotic residues, while for the February 2019 collection, approximately 47% antibiotic residues were found in the 21 samples analyzed. Antibiotics found in the 36 samples examined were predominantly Enrofloxacin, Danofloxacin and Tilmicosin. All of these antibiotics were found in minimum concentrations, not exceeding the Maximum Residue Limit (MRL) set out in European Commission Regulation n°37/2010 and can

therefore be considered not to pose a risk to the consumer, although the simultaneous presence of two or more antibiotics in the same sample may raise additional safety concerns.

Keywords: Antibiotics, Food Safety, Piglet liver, Residues detection, UHPLC-ToF-MS.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Objetivos	12
2. Revisão Bibliográfica	13
2.1) Importância do consumo de carne de suíno em Portugal.....	13
2.2) Antibióticos em alimentos de origem animal	14
2.3) Famílias de Antibióticos	16
2.3.1 Tetraciclina.....	16
2.3.2 Macrólidos.....	17
2.3.3 Sulfonamidas	18
2.3.4 Quinolonas.....	19
2.3.5 β - Lactâmicos	20
2.4) Resistência Bacteriana.....	21
2.5) Legislação para os resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal	22
2.6) Metodologias Analíticas	24
3. Legislação.....	27
3.1) Validação do método	27
3.2) Limite de decisão e capacidade de deteção	28
3.3) Veracidade	29
3.4) Recuperação.....	30
3.5) Precisão	30
3.6) Seletividade/ Especificidade.....	31

3.7) Robustez	31
4. Procedimento experimental.....	32
4.1) Materiais.....	32
4.2) Reagentes.....	32
4.3) Padrões.....	33
4.4) Soluções	33
4.5) Amostragem.....	35
4.6) Método de Extração.....	35
4.7) Método de triagem por UHPLC-ToF-MS.....	38
4.8) Procedimento de Validação.....	40
4.8.1 Seletividade/Especificidade/Aplicabilidade	40
4.8.2 Veracidade/ Recuperação	40
4.8.3 Precisão: Repetibilidade e Reprodutibilidade	41
4.8.4 Capacidade de deteção (CC α) e limite de decisão (CC β).....	41
4.8.5 Curvas de Calibração.....	41
5. Apresentação e discussão de resultados.....	42
5.1) Extensão do método	42
5.2) Extensão do método para novos compostos	43
5.3) Validação	44
5.3.1 Validação do método de triagem e confirmação.....	44
5.3.2 Curvas de calibração.....	46
5.3.3 Método de Confirmação por Fragmentação	49
5.3.4 Seletividade/ Especificidade/ Aplicabilidade	51
5.3.5 Veracidade/Recuperação.....	51
5.3.6 Precisão: Repetibilidade e Reproducibilidade.....	52
5.3.7 Capacidade de deteção e Limite de decisão.....	55
6. Análise de amostras reais de fígado de leitão	56
7. Conclusões e perspectivas futuras	62
8. Referências Bibliográficas.....	64

Índice de Figuras

Figura 1 – Consumo humano de carne em Portugal, em milhares de toneladas (t), no ano de 2016.....	13
Figura 2 – Estrutura química das Tetraciclinas.....	16
Figura 3 – Exemplo de estrutura química de um macrólido, a Espiramicina.....	17
Figura 4 – Estrutura química das sulfonamidas: Sulfadiazina (A) e sulfametoxazol (B).	18
Figura 5 – Estrutura química das quinolonas: Acido Nalidíxico (A), Acido Oxolínico (B) e Ciprofloxacina (C).....	19
Figura 6 – Estrutura química dos beta-lactâmicos: Benzilpenicilina (A) e Ceftiofur (B).....	20
Figura 7 – Mecanismos de Resistência Bacteriana.....	21
Figura 8 – As quatro fases (Condicionamento, Adição da amostra, Lavagem e Eluição) do processo de extração em fase sólida (SPE).....	36
Figura 9 – Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo.....	38
Figura 10 – Número de antibióticos detetados depois de seguidos 5 diferentes tipos de preparação de amostra com variação nas colunas SPE, incluindo os padrões internos.....	43
Figura 11 – Reta de calibração para enrofloxacinina para o dia 1.....	47
Figura 12 – Reta de calibração para enrofloxacinina, para o dia 2.....	47
Figura 13 – Reta de calibração para o composto enrofloxacinina, para o dia 3.....	48
Figura 14 – Cromatograma de UHPLC-ToF-MS para Enrofloxacinina ao nível do LMR em fígado de leitão.	49
Figura 15 – Espectro de fragmentação obtido com ToF-MS para a enrofloxacinina ao nível do LMR no fígado de leitão: A- Amostra fortificada com enrofloxacinina ao nível do LMR; B- Espectro da biblioteca.....	50
Figura 16 – Sobreposição da razão isotópica: padrão teórico e real numa amostra de fígado de leitão ao nível do LMR para a enrofloxacinina.....	50
Figura 17 – Número de antibióticos observados nas 15 amostras reais de fígado de leitão, colhidas em novembro de 2018.	59
Figura 18 - Número de antibióticos observados nas 21 amostras reais de fígado de leitão, colhidas em fevereiro de 2019.	60
Figura 19 – Resíduos de antibióticos presentes nas 36 amostras reais analisadas, em fígado de leitão.	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resumo adaptado da diretiva 96/23/CE do Conselho de 29 de abril de 1996	15
Tabela 2 – Substâncias farmacologicamente ativas e classificação no que respeita ao LMR. (Adaptado do Regulamento (UE) n° 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009).....	23
Tabela 3 – Resumo da metodologia UHPLC-ToF-MS aplicada a um vasto número de classes de antibióticos, presente em matrizes alimentares de origem animal.....	26
Tabela 4 – Características do desempenho a validar para métodos de triagem e confirmação.	28
Tabela 5 – Intervalo de veracidade aceite nos métodos quantitativos.....	29
Tabela 6 – Exemplos de CV de reprodutibilidade máxima aceite para métodos quantitativos.	31
Tabela 7 – Concentração da solução mista de trabalho para a classe dos β -lactâmicos na matriz fígado de leitão.	34
Tabela 8 – Concentração da solução mista de trabalho multiresíduo na matriz fígado de leitão.	34
Tabela 9 – Fortificações ao nível do CC β e do LMR.....	37
Tabela 10 – Fortificações para a curva de calibração.	37
Tabela 11 – Condições de funcionamento do sistema LC.....	39
Tabela 12 – Condições de funcionamento do sistema ToF-MS.....	39
Tabela 13 – Níveis de Fortificação usados para traçar as retas de calibração.....	42
Tabela 14 – Resultados da validação em fígado de leitão para o método de triagem e confirmação.....	45
Tabela 15 – Dados utilizados nos cálculos dos vários parâmetros de validação: Intensidade relativa em área da enrofloxacina obtida para o dia 1.	46
Tabela 16 – Dados utilizados nos cálculos dos vários parâmetros de validação: Intensidade relativa em área da enrofloxacina obtida para o dia 2.	47
Tabela 17 – Dados utilizados nos cálculos dos vários parâmetros de validação: Intensidade relativa em área da enrofloxacina obtida para o dia 3.	48
Tabela 18 – Valores de Recuperação (%) para cada composto.	51
Tabela 19 – Valores de Repetibilidade (%) e respetivo critério de aceitação para cada composto.....	53
Tabela 20 – Valores de Reprodutibilidade (%) e respetivo critério de aceitação para cada composto.....	54
Tabela 21 – Valores de CC β ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e CC α ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para cada um dos compostos.....	55

Tabela 22 – Concentração dos resíduos de antibióticos nas 15 amostras colhidas em novembro de 2018, e respetivo LMR.	58
Tabela 23 – Concentração dos resíduos de antibióticos para as 21 amostras colhidas em fevereiro de 2019, e respetivo LMR.....	60

Lista de Abreviaturas

ABR – Amostra branca

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroides

ATM – Antimicrobiano

BAP – Balança Alimentar Portuguesa

CC α – Limite de decisão

CC β – Limite de deteção

CE – Comissão Europeia

EDTA – Ácido etilendiamino tetracético do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”

FDA – Agência Federal Americana de Saúde Pública que regula a área dos medicamentos e da alimentação, do inglês “Food and Drug Administration”

HPLC – Cromatografia Líquida de Elevada Resolução do inglês “High Performance Liquid Chromatography”

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ISO – Organização Internacional de Normalização, do inglês “International Organization for Standardization”

LC – Cromatografia Líquida, do inglês “Liquid Chromatography”

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês “Liquid-Liquid Extraction”

LMR – Limite máximo de resíduo

MPD – Mistura de Padrões Direta

MRPL – Limite mínimo de desempenho requerido, do inglês “Minimum Required Performance Limit”

MRC – Material de referência certificado

MS/MS – Espectrometria de massa sequencial, do inglês “Tandem Mass Spectrometry”

PCBs – Bifenilos policlorados, do inglês “Polychlorinated biphenyls”

PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos

SA – Sulfonamidas

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês “Solid Phase Extraction”

S/R – Razão Sinal/Ruído

ToF-MS – Espectrómetro de massa em tempo de voo, do inglês “Time-of-Flight Mass Spectrometry”

TR – Tempo de Retenção

TRr – Tempo de Retenção Relativo

UE – União Europeia

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Elevada Resolução, do inglês “Ultra High Performance Liquid Chromatography”

UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Elevada Resolução acoplada a um detector de massa sequencial, do inglês “Ultra High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry”

UHPLC-QqToF-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Elevada Pressão - ionização electrospray - acoplada a um espectrómetro de massa com analisador de tempo de voo quadropole, do inglês “Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography electrospray ionization quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry”

UHPLC-ToF-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Elevada Resolução acoplada a um espectrómetro de massa com analisador de tempo de voo, do inglês “Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometry”

UV – Ultra Violeta

I. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho experimental foi, de acordo com a Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE, desenvolver e validar um método analítico UHPLC (Cromatografia líquida de ultra elevada resolução) acoplado a um espectrómetro de massa em tempo de voo (ToF-MS), para a deteção e quantificação de resíduos de 45 antibióticos, pertencentes a 7 famílias distintas, nomeadamente Tetraciclina, Quinolonas, Penicilinas, Macrólidos, Cefalosporinas e Trimetoprim, em fígado de leitão.

Um segundo objetivo foi a aplicação do método a amostras reais, proveniente da região da Bairrada, de forma a contribuir para um melhor conhecimento da presença de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal, tendo em atenção que tal se encontra pouco estudado em fígado de leitão.

2. Revisão Bibliográfica

2.1) Importância do consumo de carne de suíno em Portugal

Durante o ano de 2016, conforme a Balança Alimentar Portuguesa (BAP), as quantidades totais de carne disponíveis para consumo aumentaram a um ritmo médio anual de 1,6%, atingindo 80,4 kg/hab/ano, o que equivale a 220,3 g/hab/dia ^[1]. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), verificou-se que o consumo humano de carne pela população portuguesa no ano de 2016, relativamente ao grupo dos suínos foi de 45,2 kg/hab/ano, correspondendo a 39% do total de carnes consumidas nesse ano^[2]. Como podemos observar na Figura I, a carne de suínos, onde se inclui a dos leitões apresenta um grande impacto na população portuguesa. Este consumo pode dever-se, quer aos hábitos alimentares dos portugueses, quer, também, ao facto desta carne ser mais barata relativamente às outras carnes vermelhas. Destaca-se, também, as miudezas, que ocupam um lugar bastante significativo, sendo consumidas 5,3 kg/hab/ano, pela população portuguesa^[2]. É assim de extrema importância para a segurança alimentar, bem como para a saúde pública, garantir a qualidade dos produtos alimentares provenientes de suíno, como é o exemplo das chamadas miudezas, onde o fígado de leitão assume um papel relevante, quer pelo consumo do mesmo, especialmente na região da Barraida, quer, também, como matriz alimentar de excelência para a determinação de resíduos de medicamentos, em geral, e de antibióticos, em particular.

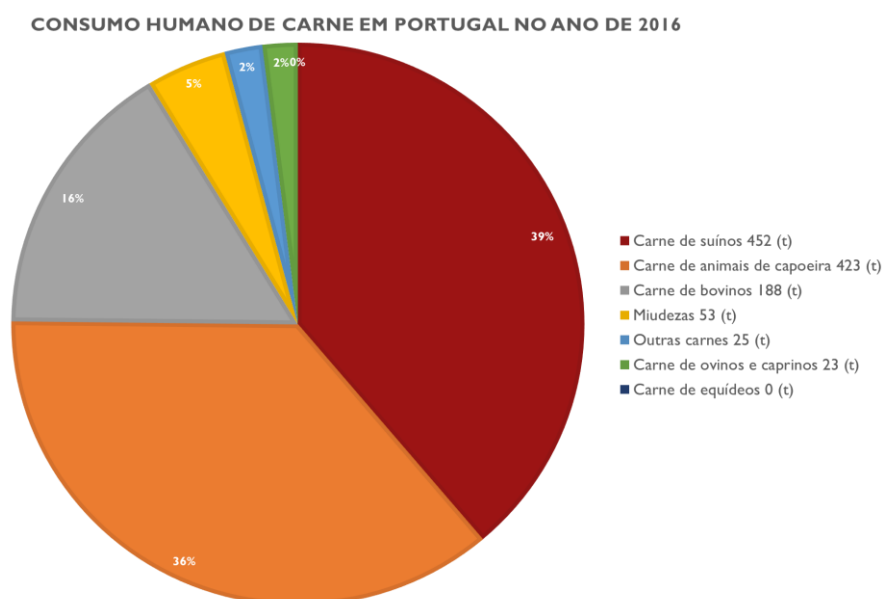


Figura I – Consumo humano de carne em Portugal, em milhares de toneladas (t), no ano de 2016.

2.2) Antibióticos em alimentos de origem animal

A pecuária intensiva pode envolver o uso de dietas, ambientes ou práticas de manejo que imponham stress fisiológico e psicológico aos animais. A elevada densidade populacional em ambientes fechados de criação de animais para consumo alimentar, potencia a partilha de agentes patogénicos que podem ser propícios à rápida disseminação de agentes infecciosos. Para combater ou prevenir essas infeções é necessário adotar medidas preventivas que muitas vezes incluem a utilização antibióticos. Os produtores de suínos enfrentam um grande desafio, visto que estes animais são bastante suscetíveis ao aparecimento de doenças infecciosas, pelo que na maioria das explorações convencionais o tratamento com agentes antimicrobianos é iniciado pouco tempo após o nascimento, quer para fins terapêuticos como profiláticos^[3]. No geral, em Portugal, os agentes antimicrobianos mais usados em suínos são tetraciclina, penicilinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e macrólidos^[4].

As possíveis consequências dessa utilização para a saúde humana são potenciadas pelo elevado consumo de alimentos de origem animal. O consumo destes alimentos contendo resíduos de agentes antimicrobianos ou seus metabolitos pode originar efeitos tóxicos diretos nos consumidores, como por exemplo reações alérgicas em indivíduos hipersensíveis, disfunções hepáticas e digestivas, problemas cardíacos, ou efeitos indiretos, como indução do desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos que são usados tanto em animais como em humanos. Atualmente este assunto tem merecido, e bem, uma enorme preocupação mundial^[5,6].

A *Food and Drug Administration* (FDA)^[7], e a União Europeia (UE)^[8] exigem um severo controlo no uso de medicamentos de utilização veterinária na criação de animais destinados à produção de produtos alimentares para consumo humano. De acordo com estes órgãos reguladores, os medicamentos veterinários são classificados em dois grupos: O grupo A compreende as substâncias com efeitos anabolizantes, bem como as substâncias não autorizadas, entre se encontram estilbenos e derivados, agentes antitireoidianos, esteroides, lactonas do ácido resorcílico, beta-antagonistas e nitrofuranos. O grupo B compreende medicamentos veterinários e outros compostos autorizados, bem como as respetivas condições de utilização. Deste grupo são exemplo os bactericidas, anti-helmínticos, sedativos, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), entre outros^[8] (Tabela 1). Assim é importante realçar que os antibióticos são amplamente usados para fins terapêuticos e profiláticos em animais produtores de alimentos. Já a sua utilização como promotores de crescimento para os animais, apesar de ainda existir, não se encontra autorizada na UE sendo, portanto, considerada ilegal^[8]. Tendo em conta todas estas circunstâncias, os

alimentos de origem animal devem ser monitorizados quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários^[9].

Tabela I – Resumo adaptado da diretiva 96/23/CE do Conselho de 29 de abril de 1996^[8].

Grupo A – Substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas

1. Estilbenos, derivados dos estilbenos, seus sais e ésteres;
 2. Agentes antitiroidianos;
 3. Esteroides;
 4. Lactonas do ácido resorcílico (incluindo o Zeranol);
 5. β - agonistas;
 6. Substâncias constantes do Anexo IV do Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho de 26 de junho 1990.
-

Grupo B – Medicamentos veterinários e contaminantes

- 1) Substâncias antibacterianas, incluindo sulfamidas e quinolonas.
 - 2) Outras medicamentos veterinários:
 - a) Antelmínticos;
 - b) Anticoccídeos, incluindo os nitroimidazóis;
 - c) Carbamatos e piretróides;
 - d) Tranquilizantes;
 - e) AINEs;
 - f) Outras substâncias que exerçam atividade farmacológica.
 - 3) Outras substâncias e contaminantes ambientais:
 - a) Compostos organoclorados, incluindo bifenilos policlorados (PCBs);
 - b) Compostos organofosforados;
 - c) Elementos químicos;
 - d) Micotoxinas;
 - e) Corantes;
 - f) Outros.
-

2.3) Famílias de Antibióticos

2.3.1 Tetraciclina

As tetraciclina com fórmula química $C_{22}H_{24}N_2O_8$, são um grupo de antibióticos amplamente usados em medicina veterinária, e atuam contra uma vasta gama de organismos Gram-positivos e Gram-negativos inibindo a síntese proteica através da ligação à subunidade ribossomal 30S^[10]. Esta família de antibióticos é usada maioritariamente para o tratamento de infeções gastrointestinais, respiratórias e bacterianas da pele. Estes compostos são relativamente estáveis em ácidos, no entanto são instáveis em bases, podendo ser fotodegradados em epímeros reversíveis. Também é importante realçar que as tetraciclina são agentes quelantes fortes, sendo a quelação de um ião metálico divalente essencial para a sua atividade antimicrobiana^[11]. Estes fatores dificultam o processo de extração destes compostos de tecidos biológicos, levando a recuperações baixas e variáveis. Para ultrapassar essas dificuldades, a extração das amostras inclui um primeiro passo com a utilização de uma solução aquosa de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) que, sendo também um agente quelante, minimiza a interação entre as tetraciclina e os referidos metais, promovendo a desproteínização e reduzindo a presença de catiões ligados a proteínas. De uma forma geral existem vários métodos analíticos para a determinação destes compostos em produtos de origem animal, entre imunoensaios e eletroforéticos, mas o mais usado ao longo dos anos tem sido a técnica de cromatografia líquida (LC)^[11]. Na Figura 2, podemos observar a estrutura química das tetraciclina.

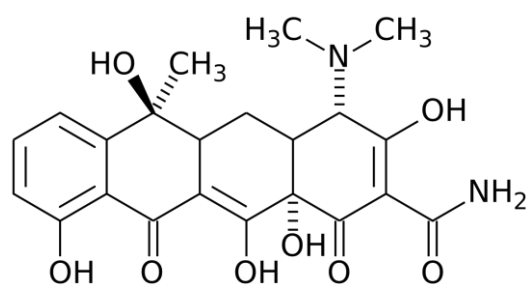


Figura 2 – Estrutura química das Tetraciclina^[11].

2.3.2 Macrólidos

Os macrólidos são um grupo importante de antibióticos, que atua contra bactérias Gram-positivas aeróbias e anaeróbias, usados em medicina veterinária maioritariamente para tratar infeções do trato respiratório, podendo também atuar como promotores de crescimento. Estes têm ação bacteriostática através da ligação à subunidade 50S do ribossoma, e inibem a síntese proteica bacteriana ^[12].

As estruturas de todos os macrólidos baseiam-se num anel lactona macrocíclico ao qual estão ligados açúcares, incluindo açúcares amino e açúcares desoxi. Os macrólidos terapêuticamente mais relevantes são aqueles que compreendem anéis 12-, 14-, 15- ou 16-associados. Um exemplo de um composto pertencente à família dos macrólidos é a espiramicina e está representada na Figura 3.

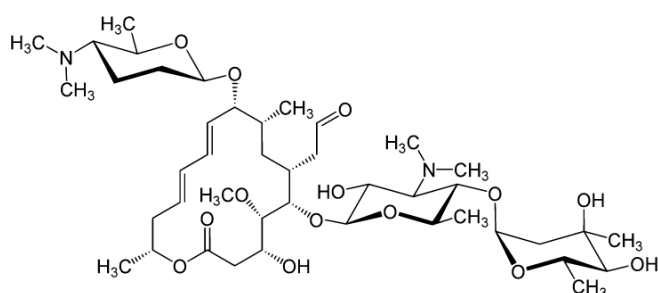


Figura 3 – Exemplo de estrutura química de um macrólido, a Espiramicina^[11].

Estas moléculas, como bases fracas, são lipofílicas, solúveis em metanol e instáveis em ácidos^[13]. A estrutura destas moléculas contém cromóforos que conferem cor às moléculas podendo ser analisados por UV ou através de deteção fluorométrica^[13]. As técnicas mais comuns usadas para extrair macrólidos de matrizes biológicas incluem SPE (extração em fase sólida) ou extração em fase líquido-líquido (LLE) usando um solvente orgânico^[11]. Recentemente, o avanço da ciência ao nível da cromatografia tem mostrado que UHPLC-ToF-MS constitui uma poderosa técnica para a identificação e quantificação inequívoca dos macrólidos. Contudo, Wang *et al.*^[14] desenvolveram duas técnicas de cromatografia líquida com espectrofotometria de massa, UHPLC-ToF-MS e LC-MS/MS, para identificação, quantificação e confirmação de 6 resíduos de antibióticos pertencentes à família dos macrólidos, em matrizes como os ovos, mel e leite cru. Estes autores concluíram que embora o LC-MS/MS tenha vantagens em termos de limites inferiores de deteção e melhor reprodutibilidade, o UHPLC-ToF-MS pode também ser uma ferramenta de confirmação permitindo até a identificação de possíveis produtos de degradação^[11].

2.3.3 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SA) são substâncias bacteriostáticas sintéticas estruturalmente baseados num grupo funcional de p-aminobenzenosulfonamida. Estes antimicrobianos de amplo espectro inibem a conversão de ácido p-aminobenzoico em dihidroperoxato, que é fundamental para a síntese do ácido fólico, tanto para as bactérias Gram negativas como positivas, e também para alguns protozoários^[11,15]. A família das sulfonamidas inclui a sulfadiazina (Figura 4A) e o sulfametoxazol (Figura 4B), entre várias outras moléculas com estrutura química semelhante. Estes compostos são bastante usados quer como terapêuticos, quer como profiláticos, tanto em humanos como em animais sendo, neste último caso, também adicionado a alimentos para animais. Existe uma preocupação sobre os níveis desses medicamentos relacionada com o facto se podem levar a sérios problemas de saúde, como por exemplo, reações alérgica ou tóxicas^[16]. Algumas sulfonamidas são potencialmente cancerígenas, levando a um debate sobre segurança alimentar para o consumidor, estando estabelecido um LMR (limite máximo de resíduo) de 100 µg/kg para a concentração total de sulfonamidas em alimentos provenientes de suínos.

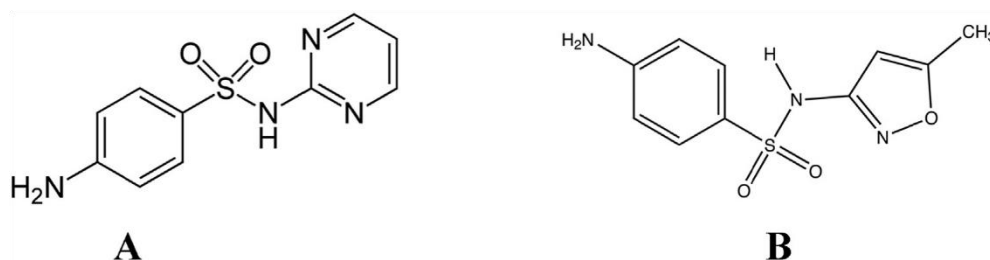


Figura 4 – Estrutura química das sulfonamidas: Sulfadiazina (A) e sulfametoxazol (B)^[11].

A extração destes compostos, tradicionalmente, é realizada com solventes orgânicos, nomeadamente com acetonitrilo, pois estes solventes são capazes de desnaturar as proteínas, o que resulta numa extração mais limpa, ajudando a libertar qualquer resíduo de antibiótico ligado à proteína^[12]. Devido à natureza complexa de algumas matrizes, uma etapa de limpeza é crucial antes da determinação cromatográfica. As técnicas de SPE e LLE estão entre as mais usadas^[12]. Quanto à deteção, métodos GC-MS são considerados inapropriados, pois este método requer derivatização, devido à elevada polaridade e baixa volatilidade destes compostos. Vários métodos para a determinação de SA, baseados em HPLC com detetor com sistema de díodos e fluorescência, têm sido relatados, no entanto,

atualmente esses métodos estão a ser substituídos por métodos com detecção por MS/MS com a vantagem de se alcançar uma maior sensibilidade e especificidade ^[16].

2.3.4 Quinolonas

As quinolonas são uma família de antibióticos sintéticos de amplo espectro sintetizados a partir do ácido 3-quinolonecarboxílico e muito utilizadas no tratamento de animais produtores ou não de alimentos, bem como, também em humanos. Estes medicamentos são amplamente utilizados para tratar infecções bacterianas respiratórias, urinárias e digestivas^[11,15]. Na Figura 5, estão representadas as estruturas químicas de três compostos pertencentes à família das quinolonas, nomeadamente ácido nalidíxico, ácido oxolínico e ciprofloxacina. A maioria das quinolonas é chamada de fluoroquinolonas uma vez que possuem um átomo de flúor ligado ao sistema central de anéis, como é o caso da ciprofloxacina apresentada na Figura 5C.

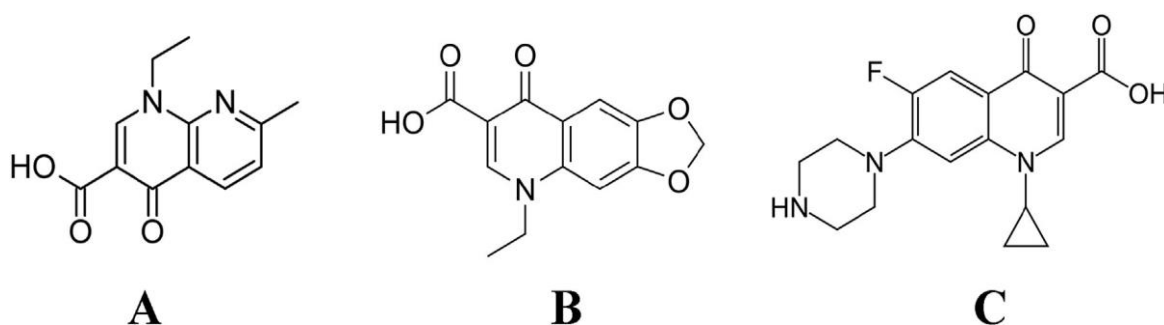


Figura 5 – Estrutura química das quinolonas: Acido Nalidíxico **(A)**, Acido Oxolínico **(B)** e Ciprofloxacina **(C)**^[11].

Entre as metodologias existentes para detetar esta classe de antibióticos, Zhang *et al.* ^[17] apresenta um método baseado em UHPLC-MS/MS, onde foram analisadas 22 quinolonas em leite. A extração dos analitos foi conseguida através de uma fase de limpeza com o auxílio da técnica SPE. A separação cromatográfica foi otimizada para permitir a melhor separação de todos os 22 compostos usando uma coluna C18 e uma fase móvel acidificada com ácido fórmico (0,2% aquoso), e metanol-acetonitrilo (40:60, v/v) que foi considerado o melhor solvente para uma maior eficiência de ionização.

2.3.5 β - Lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos, bem como todos os mencionados anteriormente, contribuem para o tratamento e prevenção de infecções bacterianas. Estes antibióticos funcionam inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana, o que tem um efeito letal sobre as bactérias. A família dos beta-lactâmicos possui dois grupos principais constituídos pelas penicilinas e pelas cefalosporinas, que têm em comum uma amina tetracíclica^[11] (Figura 6). A estrutura básica da penicilina é o ácido 6-aminopenicilânico, enquanto as cefalosporinas apresentam um núcleo ácido 7-aminocefalosporânico. Em ambos os casos, a presença do anel β -lactâmico de 4 membros, instável e termicamente lábil, torna estes compostos facilmente degradáveis pelo calor e na presença de álcoois é possível a isomerização de penicilinas em condições ácidas^[11,15].

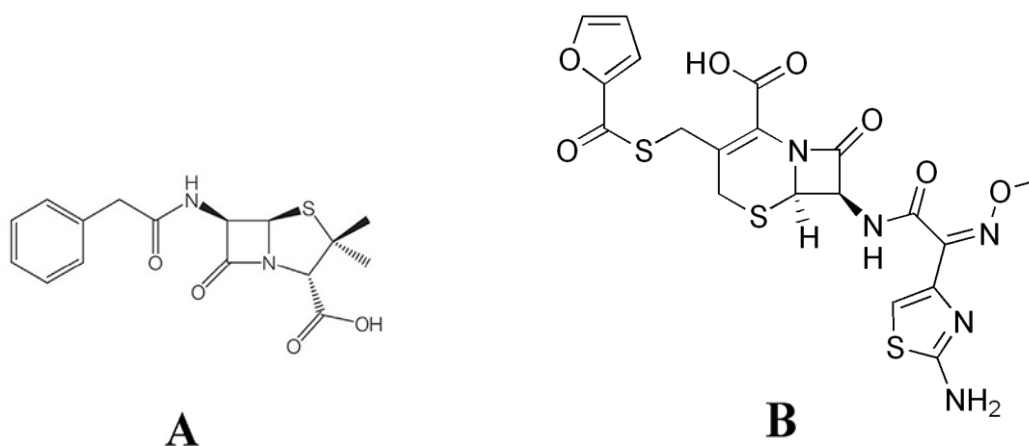


Figura 6 – Estrutura química dos beta-lactâmicos: Benzilpenicilina (**A**) e Ceftiofur (**B**)^[11].

Todos estes aspetos relativos à estabilidade destes antibióticos obrigam várias precauções quanto à temperatura e ao pH durante a preparação da amostra. Para a determinação destas duas classes de compostos: penicilinas e cefalosporinas, Mastovska *et al.*^[18], desenvolveram um método analítico para análise de multirésíduos em rim de bovino usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). As condições cromatográficas, semelhantes para todos os β -lactâmicos, consistem numa coluna C18 e, como fase móvel, água e acetonitrilo, contendo ácido fórmico. Os autores referem que o uso de metanol em vez de acetonitrilo poderia levar à degradação de alguns compostos, e também relataram que o acetonitrilo fornece melhor sensibilidade para os beta-lactâmicos testados^[11].

2.4) Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente uma das problemáticas mais relevantes a nível global afetando a saúde pública, visto que apresenta consequências clínicas e económicas preocupantes, estando associada ao uso inadequado e abusivo de antibióticos. Apesar da observação da diminuição do consumo destes fármacos nos últimos anos, Portugal, no contexto europeu, é um país com um elevado consumo de antibióticos. É importante salientar que uma proporção considerável do uso inadequado de antibióticos, que tem um papel importante na disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos, é devida ao uso destes em atividades como a veterinária, zootecnia e a pecuária, apurando-se que aproximadamente 50% da totalidade dos agentes antimicrobianos consumidos na União Europeia, não são usados em humanos ^[19].

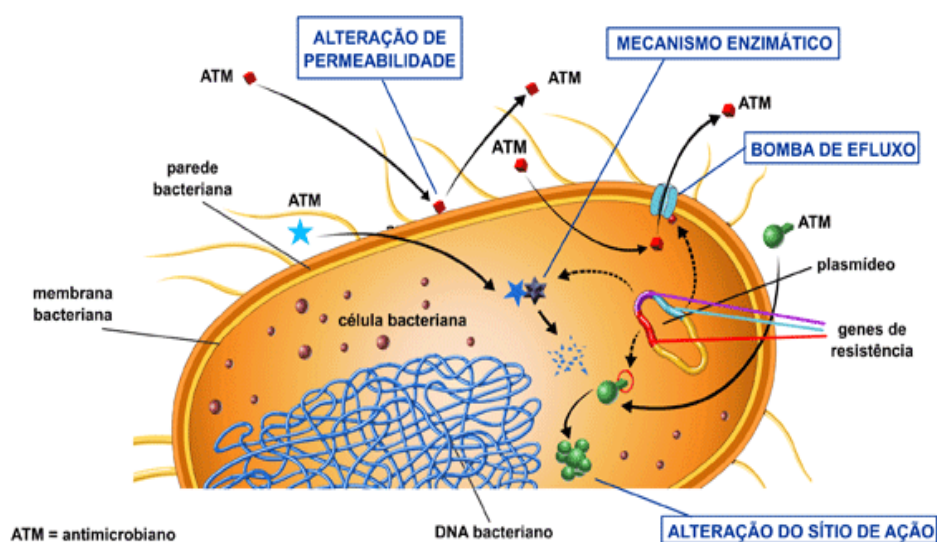


Figura 7 – Mecanismos de Resistência Bacteriana ^[20]

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um fenómeno natural, ou adquirido, resultante da pressão seletiva exercida pelo uso dos antibióticos, existindo assim uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana. Como podemos observar na Figura 7, estes mecanismos de resistência bacteriana ocorrem por alteração da permeabilidade, ação enzimática, bombas de efluxo e alteração genética do alvo ^[19].

2.5) Legislação para os resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal

O uso de antibióticos como promotores de crescimento é considerado fraudulento na Europa, pois pode levar a resíduos destes compostos que persistem em matrizes edíveis^[22]. A presença de resíduos em produtos de origem animal é motivo de preocupação em termos de saúde pública. Por esse motivo, a Comissão Europeia determinou a necessidade do controlo obrigatório dos medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal destinados ao consumo humano. Assim, foram estabelecidos limites máximos de resíduos (LMR) nos géneros alimentícios de origem animal estando os mesmos discriminados no Regulamento (UE) N°37/2010^[23].

Na Tabela 2 estão apresentados os antibióticos analisados no presente trabalho, assim como os LMRs estabelecidos para a matriz fígado de suíno.

Tabela 2 – Substâncias farmacologicamente ativas e classificação no que respeita ao LMR. (Adaptado do Regulamento (UE) n° 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009 ^[23]).

Família	Substância Farmacologicamente Ativa	LMR para fígado de suíno
Tetraciclina	Doxiciclina	300 µg/kg
	Clorotetraciclina	300 µg/kg
	Epi-Clorotetraciclina	Não estabelecido
	Epi-Tetraciclina	Não estabelecido
	Oxitetraciclina	300 µg/kg
	Tetraciclina	300 µg/kg
Sulfonamidas	Sulfacloropiridazina	100 µg/kg
	Sulfadiazina	100 µg/kg
	Sulfadimetoxina	100 µg/kg
	Sulfamethazina	100 µg/kg
	Sulfametiazol	100 µg/kg
	Sulfapiridina	100 µg/kg
	Sulfaquinoxalina	100 µg/kg
	Sulfatiazol	100 µg/kg
	Sulfisoxazol	100 µg/kg
	Sulfametoxazol	100 µg/kg
	Sulfisomidina	100 µg/kg
	Sulfadoxina	100 µg/kg
Sulfanilamida	100 µg/kg	
Outros	Trimetoprim	50 µg/kg
Macrólidos	Tilmicosina	1000 µg/kg
	Tilosina	100 µg/kg
	Espiramicina	2000 µg/kg
Quinolonas	Danofloxacina	200 µg/kg
	Ácido nalidixico	Não estabelecido
	Norfloxacina	Não estabelecido
	Ácido oxolínico	150 µg/kg
	Ofloxacina	Não estabelecido
	Enoxacina	Não estabelecido
	Cinoxacina	Não estabelecido
	Flumequina	500 µg/kg
	Marbofloxacina	150 µg/kg
	Ciprofloxacina	Não estabelecido
Enrofloxacina	200 µg/kg	
Penicilinas	Ampicilina	50 µg/kg
	Amoxicilina	50 µg/kg
	Benzilpenicilina (pen G)	50 µg/kg
	Dicloxacilina	300 µg/kg
	Oxacilina	300 µg/kg
Cefalosporinas	Nafcilina	Não estabelecido
	Cefapirina	Não estabelecido
	Cefquinoma	100 µg/kg
	Cefalonium	Não estabelecido
	Cefazolina	Não estabelecido
	Cefaperazona	Não estabelecido
	Cefalexina	Não estabelecido
Ceftiofur	2000 µg/kg	

Assim sendo, os produtos alimentares que contenham concentrações de antibióticos que excedam o LMR estabelecido são inadequados para consumo humano.

No caso de algumas substâncias proibidas ou não autorizadas, foi estabelecido um limite mínimo de desempenho requerido (MRPL) para harmonizar o desempenho analítico dos métodos utilizados em diferentes laboratórios [22].

Atualmente, métodos analíticos para determinar a presença de medicamentos veterinários em produtos alimentares de origem animal, são essenciais para o cumprimento do plano de controlo. A Decisão da Comissão Europeia (2002/657/CE)^[24] atribui a execução ao disposto na Diretiva do Conselho 96/23/CE^[8] relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. A Decisão 98/179/CE^[25] estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a usar na pesquisa de substâncias, bem como os seus resíduos em animais vivos e respetivos produtos. A análise das amostras deve ser efetuada em laboratórios aprovados pela autoridade nacional competente para o controlo oficial de resíduos, sendo necessário garantir a qualidade e comparabilidade dos resultados analíticos originados por esses laboratórios. Devem usar-se sistemas de garantia da qualidade e aplicar-se métodos validados em conformidade com procedimentos e critérios de desempenho e garantir a rastreabilidade relativamente a normas comuns. Nesse sentido, os laboratórios oficiais de controlo devem estar acreditados em conformidade com a norma ISO 17025^[26].

Em Portugal, no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária está localizado o Laboratório Nacional de Referência para a pesquisa de resíduos de medicamentos em produtos de origem animal estando acreditado de acordo com a ISO 17025^[26] e como tal é responsável pela análise das amostras de controlo oficial no nosso País.

2.6) Metodologias Analíticas

Uma grande variedade de matrizes comestíveis deve ser monitorizada quanto à presença de resíduos veterinários, incluindo músculo, fígado, rim, gordura, leite, ovos, peixe e mel^[27]. No entanto, ainda existem relativamente poucos métodos de multi-deteção e multi-classe para a determinação de antibióticos no tecido hepático. É de extrema importância realçar que ao trabalhar com tecido hepático e desenvolver a metodologia da preparação das amostras, um dos principais obstáculos está relacionado à complexidade associada aos elevados teores de proteína e gordura nessa matriz, que muitas vezes interferem no desempenho analítico. Além disso, a elevada atividade enzimática no tecido hepático pode ser responsável pela

rápida degradação de compostos lábeis, o que leva a perdas significativas durante a extração das amostras^[22].

Os métodos de multi-deteção para medicamentos veterinários são escassos, não porque não são necessários, mas devido a um número de desafios analíticos que têm que ser superados^[28]. A maioria dos métodos publicados de resíduos de medicamentos veterinários concentra-se em uma classe de compostos, como sulfonamidas, quinolonas, macrólidos, entre outros (Tabela 3). Um método para determinar um número extenso de antibióticos abrangendo várias classes no tecido hepático foi publicado por Kaufmann *et al.*^[28] sendo detetados cerca de 100 medicamentos veterinários em tecidos musculares, hepáticos e renais, pertencentes a diferentes famílias, usando UPLC-ToF-MS. Outro método capaz de determinar um número extenso destes compostos foi publicado por Orтели *et al.*^[29] que identificaram 150 medicamentos veterinários, incluindo avermectinas, benzimidazóis, beta-agonistas, beta-lactâmicos, corticoides, macrólidos, nitroimidazóis, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, entre outros, no leite cru usando UPLC-ToF-MS. Essa técnica também foi usada para triagem e quantificação de mais de 100 medicamentos veterinários no leite por Stolker *et al.*^[30]. Wang *et al.*^[31] analisaram 59 medicamentos veterinários de 7 grupos que incluíram endectocidas, fluoroquinolonas, ionóforos, macrólidos, AINEs, fenicóis e sulfonamidas, em mel e leite, utilizando UHPLC-QqToF-MS (Cromatografia Líquida de Ultra Elevada Pressão - ionização electrospray - acoplada a um espectrómetro de massa com analisador de tempo de voo quadropole) para quantificação e confirmação de seus produtos de degradação. Essa técnica também foi usada para triagem e quantificação de 90 medicamentos veterinários pertencentes a cerca de 20 classes incluindo macrólidos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclina e alguns outros no leite por Zhang *et al.*^[32], e também por Dasenaki *et al.*^[33], que desenvolveram uma metodologia para detetar 143 medicamentos veterinários e outros produtos farmacêuticos em leite e pescado.

Recentemente, novas abordagens utilizando o potencial de UHPLC-ToF-MS foram desenvolvidas para realizar métodos de triagem de resíduos multiclasse^[34].

Através das vantagens desta técnica, é possível conduzir rapidamente uma única análise para identificar simultaneamente vários compostos sem ambiguidade, bem como obter resultados preliminares quantitativos a fim de identificar uma possível amostra não compatível. Esta metodologia confirma ser uma importante ferramenta analítica para ser usada na análise de alimentos^[29]. A principal restrição ao uso de metodologias ToF-MS está relacionada com a falta de regulamentação quanto aos critérios de identificação e validação^[35].

Ora, é exatamente sobre esta falta de regulamentação, que o presente estudo inova ao apresentar uma abordagem para o uso de detecção de ToF-MS não apenas para triagem, mas especialmente para propósitos confirmatórios e que, eventualmente, possa contribuir para suprir essa falta.

Deste modo, um método UHPLC-ToF-MS foi desenvolvido e validado para detecção e quantificação de antibióticos pertencentes a 7 famílias (tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas, cefalosporinas, penicilinas, macrólidos e trimetoprim) de acordo com os requisitos estabelecidos pela Decisão 2002/657/CE da Comissão Europeia^[24]. Além disso, este estudo foi aplicado a 36 amostras reais, contribuindo para um melhor conhecimento dos resíduos de antibióticos presentes em fígado de leitões, uma vez que essa matriz é relativamente pouco estudada.

Tabela 3 – Resumo da metodologia UHPLC-ToF-MS aplicada a um vasto número de classes de antibióticos, presente em matrizes alimentares de origem animal.

Classe de antibióticos	Matriz	Metodologia analítica	Referência Bibliográfica
100 Antibióticos de 5 Classes (Tetraciclina, Quinolonas, Macrólidos, β -Lactâmicos e Aminoglicosídeos)	Fígado, Rim, Músculo	UPLC-ToF-MS	[28]
150 Antibióticos de 5 Classes (β -Lactâmicos, Macrólidos, Quinolonas, Sulfonamidas e Tetraciclina)	Leite	UPLC-ToF-MS	[29]
< 100 Antibióticos de 6 classes (Macrólidos, Penicilinas, Quinolonas, Sulfonamidas, Tetraciclina e Anfencóis)	Leite	UPLC-ToF-MS	[30]
59 Antibióticos de 7 classes (Endectocidas, Fluoroquinolonas, ionóforos, macrólidos, AINEs, fencóis e Sulfonamidas)	Mel, Leite	UHPLC-QqToF-MS	[31]
90 Antibióticos de 20 classes (Macrólidos, Sulfonamidas, Quinolonas, Tetraciclina, entre outros)	Leite	UHPLC-QqToF-MS	[32]
143 Antibióticos de 17 classes (Cefalosporinas, Macrólidos, Quinolonas, Tetraciclina, Penicilinas, Quinoxalinas, entre outros)	Leite, Músculo de Peixe	UHPLC-QToF-MS	[33]

3. Legislação

3.1) Validação do método

A validação de um método analítico é um processo de confirmação, mediante exame, e fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida. Este processo deve demonstrar se o método analítico dá cumprimento aos critérios aplicáveis às características relevantes do desempenho. Considera-se, na UE, o método validado e apto a ser usado no controlo oficial de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de origem animal, quando os parâmetros estabelecidos estiverem em conformidade com os critérios de desempenho da Decisão da Comissão 2002/657/CE^[24]. Os critérios de desempenho estabelecidos, e que devem ser estudados durante o processo de validação, são o limite de decisão $CC\alpha$, capacidade de deteção $CC\beta$, veracidade/recuperação, precisão, seletividade/especificidade/aplicabilidade e robustez.

Os métodos analíticos devem ser validados consoante os objetivos de controlo, classificando-se em métodos qualitativos ou quantitativos. Os métodos qualitativos identificam uma substância com base nas suas propriedades químicas, biológicas ou físicas, e os quantitativos determinam a quantidade ou fração mássica de uma substância de forma a poder exprimi-la através de um valor numérico com as unidades adequadas.

Estes métodos dividem-se em métodos de triagem ou confirmação. O método de triagem é utilizado para detetar a presença de uma substância numa amostra a um nível requerido, estes métodos possibilitam a capacidade para processar um elevado número de amostras num curto espaço de tempo e eleger as amostras potencialmente não conformes. O método de confirmação fornece indicações completas ou complementares para a identificação inequívoca de uma substância, sendo que os métodos cromatográficos sem deteção espetrométrica não são adequados como métodos de confirmação^[36]. Na Tabela 4 pode observar-se as características do desempenho a verificar na validação nos diferentes métodos.

Tabela 4 – Características do desempenho a validar para métodos de triagem e confirmação^[24].

		Limite de decisão CC α	Capacidade de detecção CC β	Veracidade/Recuperação	Precisão	Seletividade/Especificidade	Aplicabilidade/Robustez/Estabilidade
Métodos qualitativos	Triagem	-	+	-	-	+	+
	Confirmação	+	+	-	-	+	+
Métodos quantitativos	Triagem	-	+	-	+	+	+
	Confirmação	+	+	+	+	+	+

No procedimento de validação, as grandezas analíticas medidas a partir da análise de uma amostra são o tempo de retenção (TR) do analito ou o tempo de retenção relativo (TRr) do analito (A) relativamente a um padrão interno (Pi) utilizando a Equação 1. Na detecção por espectrometria de massa, os critérios de desempenho são fundamentados através das variações permitidas nos tempos de retenção relativos e nas razões iônicas de cada substância, calculadas em ensaios diferentes. Para a detecção por espectrometria de massa a variação máxima do TRr aceitável é de 2,5%. O desvio da massa exata (Δ ppm) é calculado através da Equação 2, sendo o critério máximo de 5 ppm.

$$\text{TRrA} = \frac{\text{TRA}}{\text{TRPi}} \text{ (Equação 1)}$$

$$\Delta \text{ ppm} = (\text{Massa exata} - \text{Massa detetada}) / \text{Massa exata} \times 10^6 \text{ (Equação 2)}$$

3.2) Limite de decisão e capacidade de detecção

O limite de decisão (CC α) é a concentração a partir da qual a amostra pode ser declarada não conforme com uma probabilidade de erro igual a α (erro de 1% para substâncias não permitidas e de 5% para substâncias com LMR. Para as substâncias com LMR, o CC α é a concentração a partir da qual, com uma certeza de 95% (1- α), a substância está presente em concentração superior ao seu LMR.

A capacidade de detecção (CC β) de um método é o teor mais baixo a partir do qual o analito pode ser detetado, identificado e quantificado com uma probabilidade de erro β (erro de 5% para substâncias permitidas ou proibidas). Para substâncias com LMR, é a concentração a que o método é capaz de detetar concentrações no limite permitido com certeza estatística de 1- β .

De acordo com a Decisão 2002/657/CE^[24], estes limites podem ser calculados através da variabilidade da resposta analítica pela razão sinal/ruído (S/R) de amostras brancas representativas das amostras laboratoriais de rotina. A Equação 3 aplica-se para medicamentos veterinários proibidos em animais destinados à produção de alimentos ou que não possuam LMR, sendo o CC α correspondente a 3 vezes a média do S/R de 20 amostras brancas.

$$CC\alpha = 3 S/R_{20 \text{ amostras brancas}} \text{ (Equação 3)}$$

Posteriormente, depois de se proceder à fortificação de 20 amostras brancas ao nível do CC α determinado, o CC β é obtido através da Equação 4, onde o SD é o desvio padrão da reprodutibilidade interlaboratorial das 20 amostras fortificadas ao nível do CC α .

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no CC}\alpha} \text{ (Equação 4)}$$

No caso de substâncias que possuam LMR ou substâncias permitidas, aplica-se a Equação 5.

$$CC\alpha = C_{LMR} + 1,64 \times SD_{20 \text{ amostras fortificadas no LMR}} \text{ (Equação 5)}$$

3.3) Veracidade

Este parâmetro corresponde ao grau de concordância entre o valor médio de uma longa série de resultados de ensaios e um valor de referência aceite. Para determinar a veracidade devem usar-se materiais de referência certificados (MRC). Os intervalos indicativos para os desvios entre o valor médio da fração mássica corrigido pela recuperação determinado experimentalmente e o valor certificado são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Intervalo de veracidade aceite nos métodos quantitativos^[24].

Fração mássica	Intervalo
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	- 50% + 20%
$> 1 \mu\text{g/kg}$ a $10 \mu\text{g/kg}$	- 30% + 10%
$\leq 10 \mu\text{g/kg}$	- 20% + 10%

3.4) Recuperação

Caso o MRC não esteja disponível, aceita-se que a veracidade das medições seja avaliada através da recuperação, pelo que deve-se fortificar 6 alíquotas de uma amostra branca (ABR) ao nível de substâncias com limite máximo de resíduos (LMR) para 3 níveis de fortificação (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR)^[24]. A recuperação é a percentagem da concentração real de uma substância que foi possível recuperar durante o processo analítico e se encontra na nossa amostra final, e pode ser calculada através da Equação 6.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Teor medido}}{\text{Nível de fortificação}} \times 100\% \text{ (Equação 6)}$$

3.5) Precisão

A precisão é a variabilidade da grandeza medida pelo uso do método em causa e em condições idênticas (repetibilidade), com modificações de pelo menos um parâmetro (reprodutibilidade) com a participação de vários laboratórios (reprodutibilidade interlaboratorial)^[24]. Para calcular a repetibilidade, devem realizar-se várias análises em paralelo com pelo menos 6 réplicas para os 3 níveis de fortificação (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR). Para a reprodutibilidade, realizam-se as mesmas análises, mas repetidas ao longo de três dias, por outro analista, ou com lotes de reagentes diferentes e em diferentes matrizes.

Este parâmetro, normalmente é calculado sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio, como podemos observar na Equação 7. Assim sendo, quanto menor o desvio padrão maior é a precisão, e quanto maior for o desvio padrão menor é a precisão.

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \text{ (Equação 7)}$$

Onde:

σ - Desvio padrão

μ - Média dos resultados

O coeficiente de variação de análises efetuadas em condições de reprodutibilidade não deve ultrapassar o coeficiente de variação interlaboratorial (CV) dado pela Equação de Horwitz (Equação 8), enquanto que 2/3 desse valor representa o limite para a repetibilidade^[24].

$$CV = 2^{(1-0.5\log C)} \text{ (Equação 8)}$$

Onde:

C é a fração mássica expressa sob a forma de potência 10.

Na Tabela 6, são discriminados alguns exemplos de CV máximo aceite para reprodutibilidade e respetiva fração mássica para os métodos quantitativos.

Tabela 6 – Exemplos de CV de reprodutibilidade máxima aceite para métodos quantitativos^[24].

Fração mássica	CV de reprodutibilidade (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg (1mg/kg)	16

(*) Para frações mássicas inferiores a 100 µg/kg, a Equação de Horwitz resulta em valores demasiado elevados, então abaixo deste nível o CV deverá ser o mais baixo possível.

3.6) Seletividade/ Especificidade

A seletividade/especificidade é a capacidade de um método fazer a distinção entre o analito e outros compostos interferentes (isómeros, metabolitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz). Este parâmetro pode ser avaliado através da análise de 20 amostras brancas (ABR's) usando a metodologia a validar e verificar a presença ou não de interferentes^[24].

3.7) Robustez

A robustez pode ser determinada através da análise ao longo do processo de desenvolvimento do método, identificando os fatores que possam estar a influenciar e deturpar os resultados, sendo eles, o analista, o lote e idade dos reagentes e solventes, as temperaturas, os valores de pH e ainda a própria amostra animal e a sua frescura já que, por

exemplo, a amostra pode degradar-se ao longo do tempo, perdendo alguns compostos. Todos estes fatores podem evidenciar, se as alterações das condições do procedimento são ou não significativas nos resultados obtidos^[24].

4. Procedimento experimental

4.1) Materiais

Ao longo do trabalho experimental realizado em laboratório, para além de todo o material de vidro disponível, foram utilizados tubos de centrífuga com capacidade de 15 mL, micropipetas de volume variável, uma trituradora, espátulas, uma balança Mettler Toledo PC200 e AE100 (Greifensee, Suíça), uma centrífuga refrigerada Heraeus Megafuge 1,0 (Hanau, Alemanha), agitadores vortex XX3 Velp Scientifica (Itália) e agitadores reax Heidolph Reax 2 overhead mixer (Schwabach, Alemanha), ultrassons Bandelin Sonorex Super RK510, um Evaporador Turbovap Zymark (Hopkinton, MA, EUA) acoplado a um gerador de azoto (pureza 99,9995%) Peak Scientific (Frankfurt, Alemanha), filtros Whatman Mini-Uniprep PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 0,45µm (Clifton, NJ, EUA), colunas SPE OASIS HLB polymeric sorbent cartridge (6mL, 200 mg) Waters (Milford, MA, USA).

A coluna cromatográfica usada foi uma Acquity UPLC HSS T3 1,8µm, 2,1x100mm da marca Waters. O sistema de UHPLC-ToF-MS é composto por UHPLC Shimadzu Nexera X2, constituído por bomba binária, injetor automático de volume variável, com sistema de refrigeração e forno para colunas da marca Shimadzu Nexera e um detetor ToF-MS, Triple TOFTM 5600+, da marca AB Sciex.

4.2) Reagentes

Durante o procedimento experimental, foram utilizados reagentes de grau analítico reconhecido e água ultra pura tipo I. No caso dos solventes usados para as fases móveis, apresentavam grau de pureza indicado para UHPLC-MS. Os reagentes utilizados foram o acetonitrilo fornecido por Honeywell (Seelze, Alemanha), metanol fornecido por Carlo Erba (Val de Reuil, França), ácido fórmico fornecido por Chemlab (Zedelgem, Bélgica), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e n-hexano fornecidos por Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha).

4.3) Padrões

Os padrões para as 7 famílias analisadas (Tetraciclina, Quinolonas, Macrólidos, Sulfonamidas, Penicilinas, Cefalosporinas e Trimetoprim) foram adquiridos na Sigma- Aldrich. Os padrões internos (PI's) fornecidos pela mesma marca foram Desmetiltetraciclina para as Tetraciclina, Lomefloxacina para as Quinolonas, Roxitromicina para os Macrólidos, Sulfameter para as Sulfonamidas e Penicilina V para as Penicilinas.

4.4) Soluções

Durante a extração, foi utilizada uma solução de EDTA com concentração de 0,1M, que foi previamente preparada através da dissolução de 29,23 g de EDTA em água até perfazer um volume total de 1 L. Para a fase móvel A, foi elaborada uma solução de ácido fórmico a 0,1% através da diluição de 1 mL de ácido fórmico em água, perfazendo o volume de 1 L, e para a fase móvel B, foi escolhido o acetonitrilo como solvente. As soluções padrão mãe foram obtidas através da dissolução de $10 \pm 0,5$ mg de cada substância padrão em 10 mL de metanol, à exceção dos β -lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas), cuja solução foi preparada em água. A concentração destas soluções mãe de cada um dos padrões variou entre os 500 e os 1000 $\mu\text{g/mL}$, pois os compostos têm LMR muito distintos. Na Tabela 7, é possível observar a concentração estimada para a solução mista de trabalho para a classe dos β -lactâmicos. De ressaltar, que o Ceftiofur foi adicionado em separado, pois possui um LMR demasiado elevado, comparado às restantes classes de compostos.

A solução mista dos padrões internos (10 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada através da dissolução de 100 μL das soluções mãe dos padrões internos Sulfameter, Roxitromicina, Lomefloxacina, com 99,7 μL de Penicilina V e 200 μL de Desmetiltetraciclina perfazendo o volume de 10 mL com metanol.

Foi preparada uma solução de trabalho multiresíduo com os volumes necessários de cada uma das soluções mãe a analisar, de forma a fortificar as amostras brancas ao nível da gama de trabalho validada (0,5 LMR, 1 LMR, 1,5 LMR, 2 LMR e 2,5 LMR), perfazendo os 10 mL com metanol. Na Tabela 8, está descrita a concentração estimada para a solução mista de trabalho multiresíduo para a família das tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprim, macrólidos e quinolonas.

Todas as soluções padrão foram devidamente acondicionadas a uma temperatura de -20°C por seis meses para as soluções mãe e um mês para as soluções de trabalho/diluições.

Tabela 7 – Concentração da solução mista de trabalho para a classe dos β -lactâmicos na matriz fígado de leitão.

LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Classe de compostos	Analito	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
50	Penicilinas	Ampicilina	2
50		Amoxicilina	
50		Benzilpenicilina (pen G)	
300		Dicloxacilina	12
300		Oxacilina	
300 (não estabelecido)		Nafcilina	
100	Cefalosporinas	Cefquinona	4
20 (não estabelecido)		Cefalonium	0,8
50 (não estabelecido)		Cefaperazona	2
50 (não estabelecido)		Cefazolium	
50 (não estabelecido)		Cefapirina	
200 (não estabelecido)		Cefalexina	4
2000		Ceftiofur	(*)

(*) O Ceftiofur tem um LMR de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, valor bastante elevado face aos restantes compostos. Por isso, o Ceftiofur não é adicionado à solução mista de trabalho para a classe dos β -lactâmicos, e é usado separadamente.

Tabela 8 – Concentração da solução mista de trabalho multiresíduo na matriz fígado de leitão.

LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Classe de Compostos	Analito	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
300	Tetraciclina	Doxiciclina	12
300		Clortetraciclina	
300		Epi-chlortetraciclina	
300		Epi-tetraciclina	
300		Oxitetraciclina	
300		Tetraciclina	
100	Sulfonamidas	Sulfacloropiridazina	4
100		Sulfadiazina	
100		Sulfadimetoxina	
100		Sulfamethazina	
100		Sulfametiazol	
100		Sulfapiridina	
100		Sulfaquinoxalina	
100		Sulfatiazol	
100		Sulfisoxazol	
100		Sulfametoxazol	
100		Sulfisomidina	

100		Sulfadoxina	
100		Sulfanilamida	
50	Outros	Trimetoprim	2
1000	Macrólidos	Tilmicosina	40
100		Tilosina	4
2000		Espiramicina	80
200		Danofloxacina	8
100 (não estabelecido)	Quinolonas	Ácido nalidixico	4
100 (não estabelecido)		Norfloxacina	
150		Ácido oxolínico	6
100 (não estabelecido)		Ofloxacina	4
100 (não estabelecido)		Enoxacina	
100 (não estabelecido)		Cinoxacina	
500		Flumequina	20
150		Marbofloxacina	6
100 (não estabelecido)		Ciprofloxacina	4
200		Enrofloxacina	8

4.5) Amostragem

As 36 amostras de fígado de leitão que foram analisadas ao longo deste estudo, foram colhidas de leitões provenientes de um matadouro na região da Bairrada (Portugal). Algumas amostras já se encontravam no laboratório devidamente armazenadas numa arca de refrigeração a -30°C há cerca de 1 ano, mas era de prever que estas amostras poderiam já não se encontrar em condições de serem analisadas. Inclusivamente é de notar que não existe nenhum estudo sobre a estabilidade dos compostos a analisar em matriz, neste caso, em fígado. Deste modo, estas amostras não foram consideradas para este procedimento experimental. Por esse motivo, foram colhidas 15 novas amostras em novembro de 2018 e 21 amostras em fevereiro de 2019. Após a colheita, as amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório em bolsas térmicas devidamente acondicionadas e posteriormente armazenadas a -80°C até análise.

4.6) Método de Extração

Foram pesados 2 gramas de amostra de fígado de leitão, previamente homogeneizado, para um tubo de centrífuga de 15 mL. Adicionou-se 50 μL da solução de padrões internos a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a todas as mostras, e posteriormente agitou-se a amostra no vortex durante 30 segundos, deixando repousar, ao abrigo da luz, durante 10 minutos. Adicionou-se 10 mL de acetonitrilo e 1 mL de solução de EDTA a 0,1M, e homogeneizou-se no reax durante 10 minutos e de seguida no ultrassons durante 20 minutos.

Centrifugou-se a 4000 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. De seguida evaporou-se até perto da seca, cerca de 1 mL. Adicionou-se 5 mL de água ultrapura e agitou-se no vortex durante 15 segundos.

A técnica de extração utilizada neste procedimento experimental foi a SPE, uma vez que demonstrou ser útil para muitos propósitos. A título de exemplo, refira-se que isolamento, concentração, purificação e limpeza são as principais abordagens nas práticas deste método. A etapa de preparação da amostra tem um papel crucial para a determinação de compostos específicos nas matrizes alimentares^[37] e, no caso da SPE, divide-se em quatro etapas distintas: condicionamento, adição da amostra, lavagem e eluição, como está representado na Figura 8.

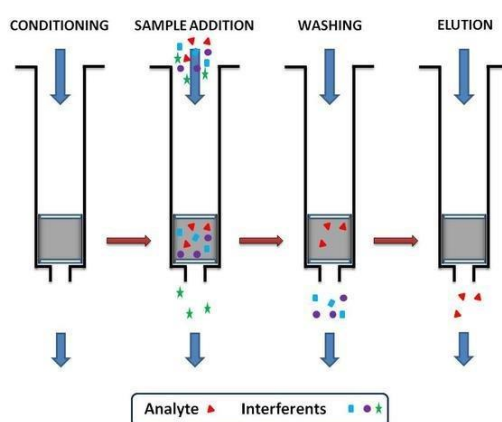


Figura 8 – As quatro fases (Condicionamento, Adição da amostra, Lavagem e Eluição) do processo de extração em fase sólida (SPE)^[38]

Acondicionaram-se as colunas SPE OASIS HBL 200 mg, com 10 mL de acetonitrilo e 10 mL de água ultrapura, de seguida passou-se o extrato pelas colunas e lavaram-se as mesmas com 5 mL de água, após foram secas, por vácuo, durante aproximadamente 5 minutos.

Eluíram-se os compostos das colunas SPE com 10 mL de acetonitrilo para novos tubos de centrifuga de 15 mL, e levou-se novamente a evaporar até cerca de 0,5 mL no Turbovap.

Adicionou-se 400 µL de fase Móvel A (Ácido Fórmico a 0,1% em água) e 2 mL de n-hexano, e agitou-se 30 segundos no vortex. De seguida, centrifugou-se durante 10 minutos a 4000 x g e descartou-se o n-hexano. Filtrou-se com Mini uniprepTM 0,45 µm, e injetou-se com um injetor automático no sistema UHPLC.

Simultaneamente com as amostras a analisar, e numa primeira análise considerada como método inicial de triagem, fez-se a extração de uma amostra branca (ABR), uma amostra branca fortificada ao nível do CCβ (0,5 LMR) e uma amostra fortificada ao nível do LMR, conforme o descrito na Tabela 9. Em simultâneo, preparou-se uma mistura de padrão direta

(MPD) à qual foi adicionada 50 µL da solução mista de trabalho multiresíduos, 50 µL da solução mista de trabalho dos β-lactâmicos, 40 µL da solução mãe de Cefotiofur, 50 µL da solução dos Padrões internos e 200 µL de fase móvel A.

Tabela 9 – Fortificações ao nível do CCβ e do LMR.

	ABR	CCβ	LMR	MPD
Solução Mista de Trabalho Multiresíduos (µL)	0	25	50	50
Solução β- Lactâmicos (µL)	0	25	50	50
Ceftiofur (µL)	0	20	40	40
Solução dos Padrões Internos (µL)	50	50	50	50

No método de confirmação, as amostras foram analisadas em duplicado e juntamente com estas, fez-se a extração de uma amostra em branco, bem como foi preparada uma curva de calibração composta por cinco amostras fortificadas ao nível do LMR: 0,5 LMR, 1 LMR, 1,5 LMR, 2 LMR e 2,5 LMR, conforme apresentado na Tabela 10. Preparou-se também uma mistura de padrão direta (MPD) ao nível do LMR, com 50 µL de solução mista de trabalho multiresíduos, 50 µL da solução mista de trabalho dos β-lactâmicos, 40 µL da solução mãe de ceftiofur, 50 µL da solução mista dos padrões internos (Pi) e 200 µL da fase móvel A.

Tabela 10 – Fortificações para a curva de calibração.

	0,5 LMR (ABF1)	1 LMR (ABF2)	1,5 LMR (ABF3)	2 LMR (ABF4)	2,5 LMR (ABF5)
Solução Mista de Trabalho Multiresíduos (µL)	25	50	75	100	125
Solução β-Lactâmicos (µL)	25	50	75	100	125
Ceftiofur (µL)	20	40	60	80	100
Solução Padrões internos (µL)	50	50	50	50	50

4.7) Método de triagem por UHPLC-ToF-MS

O método UHPLC-ToF-MS tem sido o método de triagem mais usado para a detecção de resíduos de antibióticos em matrizes alimentares provenientes de animais destinados ao consumo humano. A combinação da cromatografia líquida de alta resolução com ToF, hoje em dia é apresentada como uma ferramenta eficaz em termos de seletividade, sensibilidade e rapidez. Na Figura 9, está representado o equipamento de UHPLC-ToF-MS utilizado para a validação do método de triagem no INIAV.



Figura 9 – Cromatografia líquida de elevada resolução acoplada a detetor de massa com analisador por tempo de voo.

Na Tabela 11, estão descritas as condições de funcionamento do sistema LC, nomeadamente o fluxo, o volume de injeção, tempo de corrida, temperatura da coluna e do amostrador, as fases móveis usadas e as condições do gradiente ao longo do tempo. Na Tabela 12, são designadas as condições de operação do sistema ToF-MS, ou seja: modo de ionização, gama de massas, gás cortina, gás 1 e 2, neste caso o azoto, temperatura e voltagem.

Tabela 11 – Condições de funcionamento do sistema LC.

Fluxo	0,5 mL/minuto		
Volume de injeção	10 µL		
Tempo de corrida	11 minutos		
Temperatura da coluna	40°C		
Temperatura do amostrador	10°C		
Fases móveis	Fase móvel A: 0,1% de ácido fórmico em água		
	Fase móvel B: Acetonitrilo		
Condições do gradiente	Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
	0	97	3
	2	97	3
	5	40	60
	9	0	100
	10	3	97
	11	97	3

Tabela 12 – Condições de funcionamento do sistema ToF-MS.

Modo de ionização	Electrospray, modo positivo
Gama de massas (Da)	100-920
Gás cortina (CUR)	25 psig
Gás 1 (psig)	45 psig
Gás 2 (psig)	45 psig
Temperatura (°C)	575 °C
Voltagem (V)	5500 V

4.8) Procedimento de Validação

Como foi descrito anteriormente, a validação do método analítico para detecção e quantificação de antibióticos em fígado de leitão foi executada tendo em conta os critérios de validação da Decisão da Comissão 2002/657/CE^[24]. Para o procedimento de validação do método de triagem, foram analisadas 20 amostras brancas, bem como 20 amostras fortificadas ao nível do CC β , correspondente a 0,5 LMR. Quanto às 20 amostras brancas, estas foram realizadas para se verificar se continham ou não algum tipo de resíduo ou interferente que pudesse afetar a identificação dos analitos pesquisados.

Os critérios de identificação avaliados foram o Tempo de Retenção Relativo (TRR), cuja variação deverá ser inferior a 2,5% e a massa exata cujo desvio deverá ser inferior a 5 ppm.

Relativamente à validação do método de confirmação, os critérios de identificação foram baseados na exatidão de massa, tempo de retenção, razão isotópica e padrão de fragmentação, respeitando os mesmos critérios do método de triagem (TRR<2,5% e $\Delta m < 5$ ppm).

Para a razão isotópica foi considerado um desvio máximo aceitável de 10%, e para o padrão de fragmentação o valor mínimo aceite para a identificação positiva foi estabelecido para 70%. Visto que estes dois parâmetros não constam na legislação, estes valores foram estimados internamente após a validação de outras metodologias, onde se chegou à conclusão da veracidade dos mesmos, foi também tida em consideração o aconselhamento do fabricante como sendo critérios de aceitação recomendados.

4.8.1 Seletividade/Especificidade/Aplicabilidade

Para o parâmetro seletividade/especificidade/aplicabilidade procedeu-se à análise de 20 amostras brancas aplicando o método a validar, ou seja UHPLC-ToF-MS. Este método faz parte do procedimento de rotina do laboratório, onde são analisadas diversas matrizes animais. Assim sendo, foi feita a extensão para fígado de leitão para comprovar a seletividade/especificidade/aplicabilidade do método. A extensão do método, foi performada a partir do método anteriormente validado, em 2014, por Freitas, A. e colaboradores ^[22].

4.8.2 Veracidade/ Recuperação

O parâmetro de veracidade não foi possível determinar neste procedimento experimental, pois não haviam materiais de referência certificados (MRC) disponíveis no laboratório. Assim, e como mencionado anteriormente, caso o MRC não esteja disponível, aceita-se que a veracidade das medições seja avaliada através da recuperação.

Para determinar a recuperação, foram fortificadas 6 amostras brancas para cada uma das concentrações (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR), foi aplicado o método analítico a validar e calculou-se a concentração final para cada amostra. A recuperação foi calculada com o auxílio da Equação 6 e verificou-se se cada um dos antibióticos pesquisados se encontrava conforme os valores aceitáveis.

4.8.3 Precisão: Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para a determinação da repetibilidade, preparou-se um conjunto de amostras brancas fortificadas a 0,5 LMR, LMR e 1,5 LMR. Para cada nível, fizeram-se seis duplicados. Calculou-se, também para cada nível, a concentração média obtida, o desvio-padrão e o CV, repetindo-se o mesmo processo para mais dois dias distintos.

Quanto ao parâmetro reprodutibilidade, um conjunto de amostras brancas fortificadas a 0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR, foi devidamente preparado, sendo que para cada nível foram feitos 6 duplicados. Repetiu-se o mesmo procedimento mais duas vezes, em dias diferentes e com diferente operador. Calculou-se, para cada nível, a concentração média obtida, o desvio-padrão e o CV (Equação 7). Os valores de repetibilidade e de reprodutibilidade foram confrontados com os valores aceitáveis, de acordo com a Equação de Horwitz (Equação 8).

4.8.4 Capacidade de detecção ($CC\alpha$) e limite de decisão ($CC\beta$)

A capacidade de detecção e o limite de decisão foram calculados através das equações 4 e 5. Para estes parâmetros, 20 amostras brancas foram fortificadas ao nível do LMR, seguindo o processo analítico a validar.

Para compostos cujo o LMR não esteja estabelecido no Regulamento nº37/2010^[23], foram estimadas concentrações semelhantes a um composto pertencente à mesma família de antibióticos, e que possua LMR estabelecido, a fim de obter um valor o mais coerente possível.

4.8.5 Curvas de Calibração

As curvas de calibração foram construídas através da fortificação de amostras brancas com seis níveis de concentração distintos: ABF1 corresponde a 0,5 LMR, ABF2 corresponde a 1 LMR, ABF3 corresponde a 1,5 LMR, ABF4 corresponde a 2 LMR e por fim ABF5 corresponde a 2,5 LMR, conforme o descrito na Tabela 10. A extração das amostras para a curva foi repetida em três dias diferentes e foram utilizados lotes de reagentes distintos ao longo deste procedimento experimental. Na Tabela 13, são descritos os níveis de

fortificação usados e o respetivo número de réplicas efetuadas em cada um dos três dias de validação.

Tabela 13 – Níveis de Fortificação usados para traçar as retas de calibração

Designação da amostra	Concentração	Número de réplicas
ABF 1	0,5 LMR	6
ABF 2	1 LMR	6
ABF 3	1,5 LMR	6
ABF 4	2 LMR	1
ABF 5	2,5 LMR	1
ABR	0	1

5. Apresentação e discussão de resultados

5.1) Extensão do método

Freitas e colaboradores, em 2014^[22], validaram uma metodologia multi-resíduos e multi-classe para determinação de antibióticos em fígado de bovino, e para tal, recorreram a SPE com colunas OASIS HBL. No seguimento deste estudo, pretendeu-se otimizar o método de extração anteriormente publicado. Como se trata de uma matriz complexa, foram testadas algumas colunas de SPE que poderiam ser mais vantajosas para facilitar a identificação dos compostos pesquisados, a fim de obter um extrato o mais limpo possível, com menos interferentes que possam comprometer a identificação dos nossos compostos e assim otimizar recuperações. Quatro diferentes tipos de colunas SPE foram testadas: C18 200 mg, C18 500 mg, OASIS HBL 200 mg e Prime HBL 200 mg com e sem etapa de limpeza. No caso destas últimas colunas, foi aconselhado pelo fabricante a utilização destas colunas sem pré-condicionamento.

Através da observação da Figura 10, foi possível concluir que a coluna OASIS HBL 200 mg apresentou os melhores resultados, onde foram observados 52 compostos pertencentes às 7 famílias de antibióticos, nos quais, 5 correspondem aos padrões internos. Deste modo, a coluna OASIS HBL 200 mg foi a selecionada para este processo experimental na matriz fígado de leitão. Esta coluna, foi também a escolhida e utilizada pelos autores que

validaram um método para a determinação de antibióticos em fígado de bovino^[22], no estudo referido anteriormente.

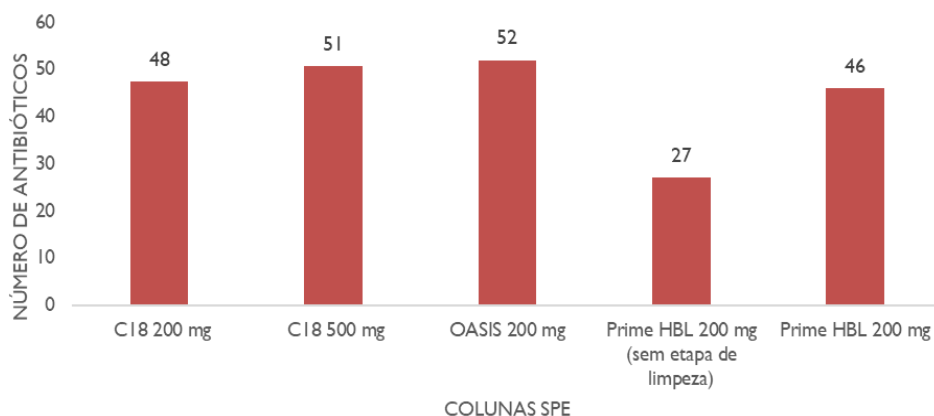


Figura 10 – Número de antibióticos detetados depois de seguidos 5 diferentes tipos de preparação de amostra com variação nas colunas SPE, incluindo os padrões internos.

5.2) Extensão do método para novos compostos

Pelo mesmo autor referido anteriormente, foram validados 39 antibióticos para o fígado de bovino em 2014^[22], dos quais apenas 5 antibióticos não foram introduzidos na validação do método em fígado de leitão, a saber, Sulfametazina, Sulfametoxipiridazina, Eritromicina, Amoxiciclina e Clorofenicol. Contudo, foram validados e introduzidos neste trabalho experimental mais 11 novos compostos, dos quais 6 pertencem à família das Cefalosporinas (Cefalonium, Cefapirina, Cefazolina, Cefoperazona, Cefquinoma e Ceftiofur), 2 pertencentes à família das Tetraciclina (Epi-Clorotetraciclina e Epi-Tetraciclina), 2 pertencentes à família das Penicilinas (Ampicilina e Benzilpenicilina) e 1 pertencente à família das Sulfonamidas (Sulfadimidina).

Assim sendo, neste estudo foi possível realizar a extensão de 39 para 45 compostos. Seguindo o mesmo procedimento de extração e de validação, analisando tanto de amostras brancas como amostras brancas fortificadas, concluímos que a identificação destes compostos era inequívoca e por isso, a validação demonstrou que o método pode ser utilizado também para estes compostos.

5.3) Validação

O desempenho do método multiresíduos para a detecção e confirmação dos 45 antibióticos pertencentes a 7 famílias distintas foi verificado através do estudo de validação tendo em conta os critérios da Decisão da Comissão 2002/657/CE^[24], como já foi referido. Nos pontos seguintes estão apresentados, para cada parâmetro de validação, os resultados obtidos assim como a interpretação dos mesmos relativamente aos critérios que guiaram este processo.

5.3.1 Validação do método de triagem e confirmação

Para a validação do método de triagem, foram analisadas 20 amostras brancas ao nível do CC α , sendo os critérios de identificação o tempo de retenção e o desvio da massa exata. Os TRR foram calculados através da Equação 1, descrita anteriormente. Na Tabela 14, estão representados os resultados para todos os 45 antibióticos validados neste trabalho experimental. Para a detecção no que diz respeito ao máximo de desvio obtido TRR (%) e ao erro máximo do desvio de massa (ppm), verificou-se que para todos os compostos, os critérios foram respeitados (TRR < 2,5% e $\Delta m < 5$ ppm).

O máximo desvio TRR encontrado foi para os compostos Cefquinoma e Dicloxacilina com 0,8 %, com um erro máximo de desvio de massa de -0,9 ppm e -1 ppm, respetivamente.

O erro máximo do desvio de massa encontrado foi para os compostos Ampicilina e Marbofloxacina com 3,5 ppm e 2,9 ppm, respetivamente.

Na Tabela 14 também são apresentados os resultados para o método de confirmação através do score do espetro de fragmentação (%). Para este parâmetro o valor mínimo aceite para a identificação positiva foi estabelecido para 70%, e este critério foi respeitado para todos os compostos estudados.

O composto onde se obteve um maior desvio para este parâmetro foi o Cefalonium com 99,9%, e onde se verificou um menor desvio foi para o composto Enoxacina com 81% de score do espetro de fragmentação.

Tabela 14 – Resultados da validação em fígado de leitão para o método de triagem e confirmação.

COMPOSTO	FÓRMULA	[M+H] ⁺ (Da)	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	DETECÇÃO		CONFIRMAÇÃO
				MÁXIMO DE DESVIO OBTIDO TRR (%)	ERRO MÁXIMO (ppm)	SCORE ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO (%)
Ampicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	350,11690	4,10	0,4	3,5	98,4
Benzilpenicilina	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	335,10601	4,40	0,3	2,5	93,8
Cefalonium	C ₂₀ H ₁₈ N ₄ O ₅ S ₂	459,07914	4,20	0,4	0,6	99,9
Cefapirina	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₆ S ₂	424,06316	3,90	0,7	0,7	99,5
Cefazolina	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃	455,03729	4,50	0,4	0,8	98,1
Cefaperazona	C ₂₅ H ₂₇ N ₉ O ₈ S ₂	646,14968	4,80	0,4	-2,4	94,7
Cefquinoma	C ₂₃ H ₂₄ N ₆ O ₅ S ₂	529,13224	4,00	0,8	-0,9	96,9
Ceftiofur	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃	524,03629	5,10	0,3	0,7	99,2
Clorotetraciclina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479,12157	4,40	0,2	0,5	96,3
Cinoxacina	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₅	263,06625	4,97	0,5	1	91,7
Ciprofloxacina	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332,14050	4,20	0,4	3,3	89,3
Danofloxacina	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	358,15615	4,30	0,5	0,9	90,5
Dicloxacilina	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	470,03387	6,10	0,8	-1	98,5
Doxiciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,16054	4,70	0,1	0,6	95,0
Enoxacina	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	321,13575	4,20	0,4	0,9	81,0
Enrofloxacina	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360,17180	4,30	0,3	1,8	83,9
Epi-Clorotetraciclina	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	479,12157	4,27	0,2	0,9	93,3
Epi-Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,16054	4,16	0,2	0,9	88,6
Flumequina	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	262,08740	5,60	0,5	1,3	90,9
Marbofloxacina	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	363,14631	4,12	0,2	2,9	89,1
Nafcilina	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	415,13222	6,00	0,3	0,4	95,7
Ácido Nalidíxico	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	233,09207	5,50	0,4	-0,9	97,4
Norfloxacina	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	320,14050	4,20	0,3	2,8	84,8
Ofloxacina	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362,15106	4,20	0,2	2,4	90,3
Oxacilina	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	402,11182	5,70	0,3	-0,9	91,7
Ácido Oxolínico	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	262,07100	5,10	0,4	1,3	90,4
Oxitetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	461,15546	4,25	0,1	0,4	92,8
Espiramicina	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	843,52128	4,50	0,7	0,9	98,4
Sulfacoropiridazina	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	285,02075	4,90	0,6	-1	78,6
Sulfadiazina	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251,05972	3,90	0,3	1	93,9
Sulfadimetoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311,08085	5,30	0,2	0,9	94,3
Sulfadimidina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279,09102	4,55	0,2	-1,7	85,0
Sulfadoxina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311,08085	4,95	0,4	1,9	98,2
Sulfametiazol	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	271,03180	4,50	0,4	1	88,4
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254,05939	4,95	0,4	-0,9	93,7
Sulfanilamida	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S	173,03793	1,30	0,6	-1	95,7
Sulfapiridina	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250,06447	4,16	0,5	-0,8	94,3
Sulfaquinoxalina	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301,07537	5,30	0,3	0,9	92,9
Sulfatiazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256,02090	4,15	0,4	1,1	98,7
Sulfisomidina	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279,09102	3,80	0,5	1,1	90,3
Sulfisoxazol	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	268,07504	5,00	0,1	0,9	92,6
Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	445,16054	4,30	0,7	1	89,0
Tilmicosina	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869,57332	4,80	0,3	0,7	98,6
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	291,14517	4,12	0,1	0,9	90,0
Tilosina	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916,52643	5,10	0,1	0,7	93,6

5.3.2 Curvas de calibração

As curvas de calibração, foram traçadas em triplicado para cada um dos antibióticos a partir da análise de amostras brancas fortificadas em concentrações próximas do LMR. Ou seja, para a realização das curvas de calibração, as amostras foram fortificadas nas concentrações 0,5 LMR, 1 LMR, 1,5 LMR, 2 LMR e 2,5 LMR durante três dias distintos. Dado ao número elevado de compostos analisados e de forma a simplificar a apresentação dos resultados, foi selecionado um dos compostos entre os 45 compostos validados, novamente a enrofloxacin, pertencente à família das quinolonas, a título de exemplo. Neste caso, a enrofloxacin tem um LMR de 200 µg/kg para o fígado de suíno, e por isso as amostras foram fortificadas com 100, 200, 300, 400 e 500 µg/kg, e com o padrão interno correspondente, lomefloxacin.

Para a determinação recorreu-se à área do pico de enrofloxacin da transição iónica mais intensa e calculou-se a área relativa a partir da razão entre a área desse pico e a do padrão interno conforme apresentado nas Tabelas 15, 16 e 17 para cada um dos três dias.

O critério de linearidade estabelecido foi o de que o correspondente coeficiente de correlação fosse superior a 0,95 ($R^2 > 0,95$), critério que foi observado em todas as moléculas nos três dias de validação. Nas Tabelas 15, 16 e 17 estão apresentados os valores da intensidade relativa da área do composto enrofloxacin, obtidos em cada um dos 3 dias e para as concentrações analisadas. As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as retas de calibração, correspondentes, obtidas em cada um dos três dias.

Tabela 15 – Dados utilizados nos cálculos dos vários parâmetros de validação: Intensidade relativa em área da enrofloxacin obtida para o dia 1.

Concentração	DIA 1						MÉDIA Y
0,000	0,000						0,000
500,000	2,803						2,803
100,000	0,539	0,549	0,526	0,562	0,575	0,566	0,553
200,000	1,081	1,081	1,079	1,128	1,239	1,179	1,131
300,000	1,592	1,572	1,554	1,667	1,617	1,643	1,607
400,000	1,858						1,858

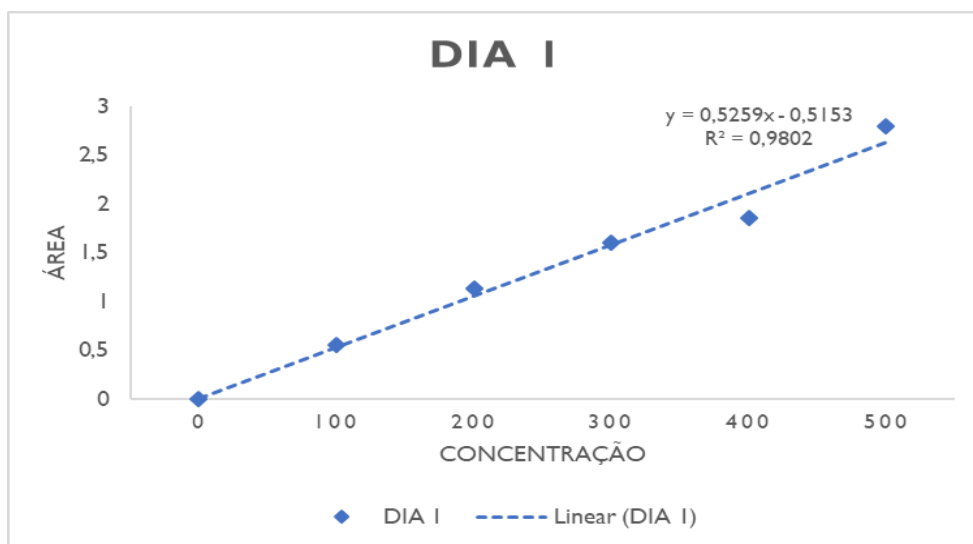


Figura 11 – Reta de calibração para enrofloxacin para o dia 1.

Tabela 16 – Dados utilizados nos cálculos dos vários parâmetros de validação: Intensidade relativa em área da enrofloxacin obtida para o dia 2.

Concentração	DIA 2						MEDIA Y
0,000	0,000						0,000
500,000	2,845						2,845
100,000	0,598	0,628	0,574	0,601	0,686	0,689	0,629
200,000	1,071	1,171	1,295	1,278	1,163	1,294	1,212
300,000	1,702	1,598	1,657	1,820	1,756	1,705	1,706
400,000	1,838						1,838

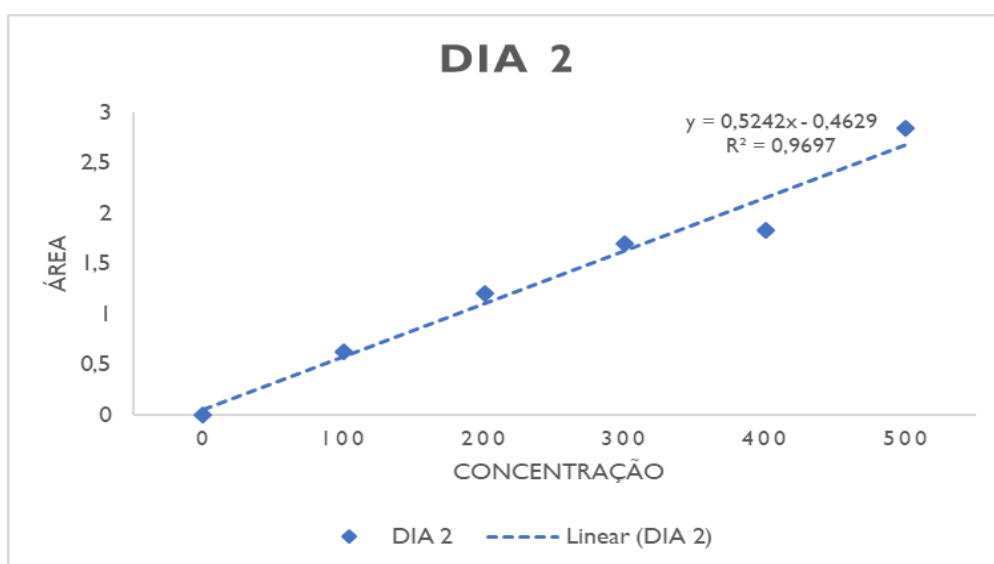


Figura 12 – Reta de calibração para enrofloxacin, para o dia 2.

Tabela 17 – Dados utilizados nos cálculos dos vários parâmetros de validação: Intensidade relativa em área da enrofloxacin obtida para o dia 3.

Concentração	DIA 3						MÉDIA Y
0,000	0,000						0,000
500,000	2,620						2,620
100,000	0,533	0,504	0,325	0,554	0,518	0,573	0,501
200,000	1,095	1,095	1,094	1,096	1,070	1,151	1,100
300,000	1,437	1,264	1,495	1,329	1,346	1,423	1,382
400,000	1,619						1,619

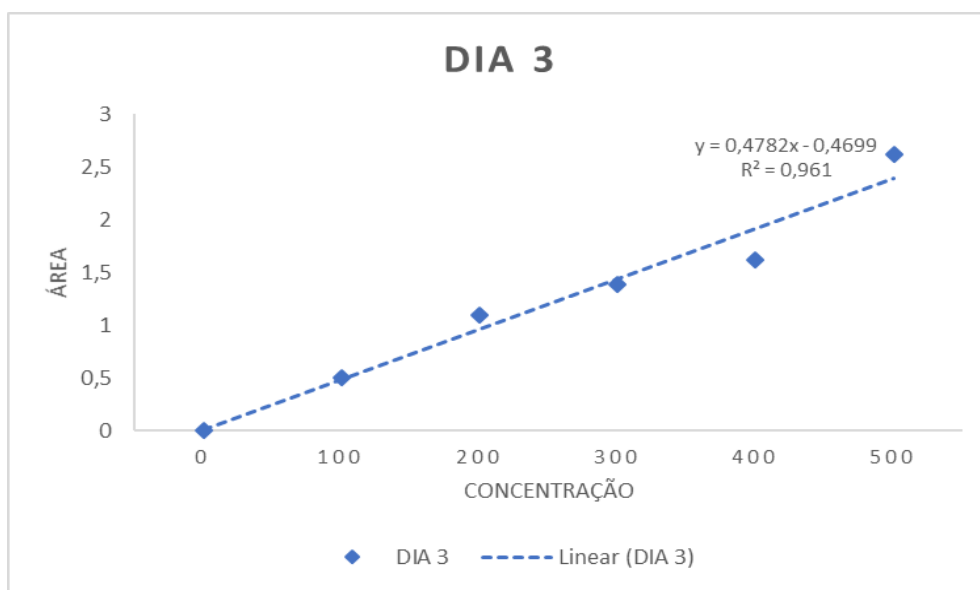


Figura 13 – Reta de calibração para o composto enrofloxacin, para o dia 3.

5.3.3 Método de Confirmação por Fragmentação

O presente estudo, como atrás se referiu, pretende propor critérios de validação, baseados nos princípios estabelecidos na Decisão da Comissão 2002/657/CE^[24] e nos princípios definidos na secção 4.8, para a utilização da metodologia ToF-MS como método de confirmação. Os critérios de identificação assentam em quatro parâmetros: exatidão de massa, tempo de retenção, razão isotópica e padrão de fragmentação. Tomando como exemplo a enrofloxacinina (antibiótico mais vezes detetado no nosso estudo – ver resultados no capítulo 6), na Figura 14 é possível avaliar a aceitação dos dois primeiros critérios: $\Delta RRT < 2,5\%$ e $\Delta m < 5$ ppm, ambos cumpridos, e nas Figuras 15 e 16 apresentam-se os resultados referentes aos outros dois parâmetros.

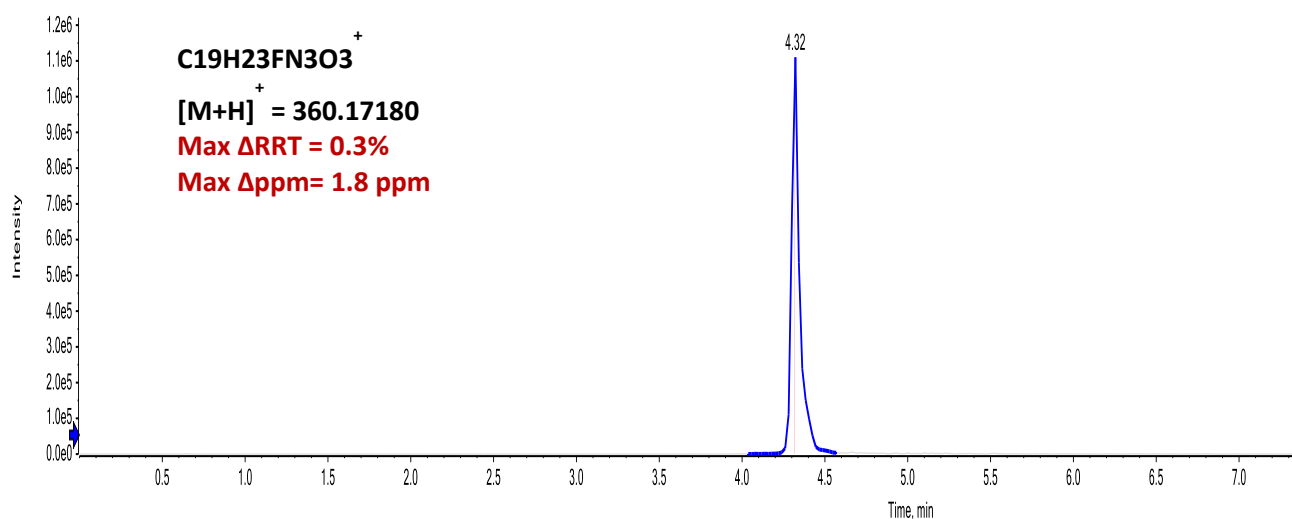


Figura 14 – Cromatograma de UHPLC-ToF-MS para Enrofloxacinina ao nível do LMR em fígado de leitão.

Na Figura 15, é apresentado o espectro de fragmentação, onde A é o espectro da amostra enriquecida ao nível do LMR para a enrofloxacinina e B é o espectro retirado da biblioteca LibraryViewTM Software, fornecida juntamente com o equipamento (Siex), para esse mesmo composto. Para este composto ao nível de LMR numa amostra fortificada, a sobreposição dos espectros foi de 98% tendo-se obtido durante a validação um mínimo para este composto de 83,9%.

O antibiótico onde foi verificado o máximo score de fragmentação corresponde ao cefanolium com 99,9% e o mínimo score de fragmentação observado foi para a enoxacinina com 81%. Para os demais compostos analisados, o score obtido foi sempre superior a 70%, respeitando o valor definido como o mínimo aceite para uma identificação positiva.

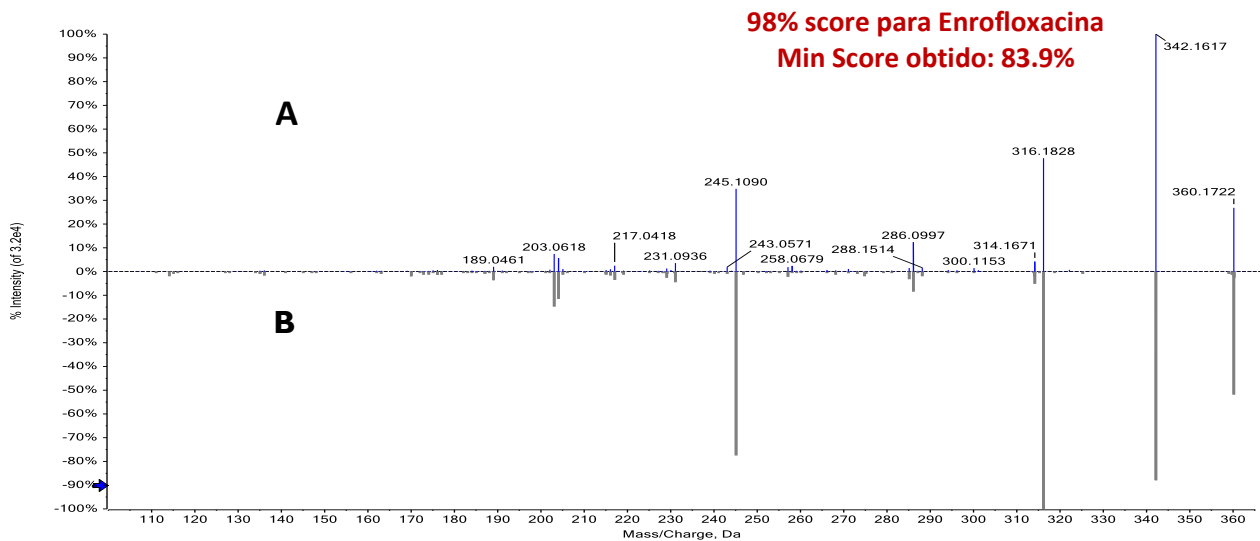


Figura 15 – Espetro de fragmentação obtido com ToF-MS para a enrofloxacin ao nível do LMR no fígado de leitão: A- Amostra fortificada com enrofloxacin ao nível do LMR; B- Espetro da biblioteca.

Em relação à razão isotópica, durante o processo de validação, as diferenças encontradas entre o padrão teórico e o padrão real, foram inferiores a 10% para todos os compostos, respeitando assim o critério de aceitação. Na Figura 16, é apresentado um exemplo para a enrofloxacin, novamente ao nível do LMR, onde é possível observar uma diferença de apenas 3% entre o calculado pelo software e o obtido para uma amostra fortificada de fígado de leitão.

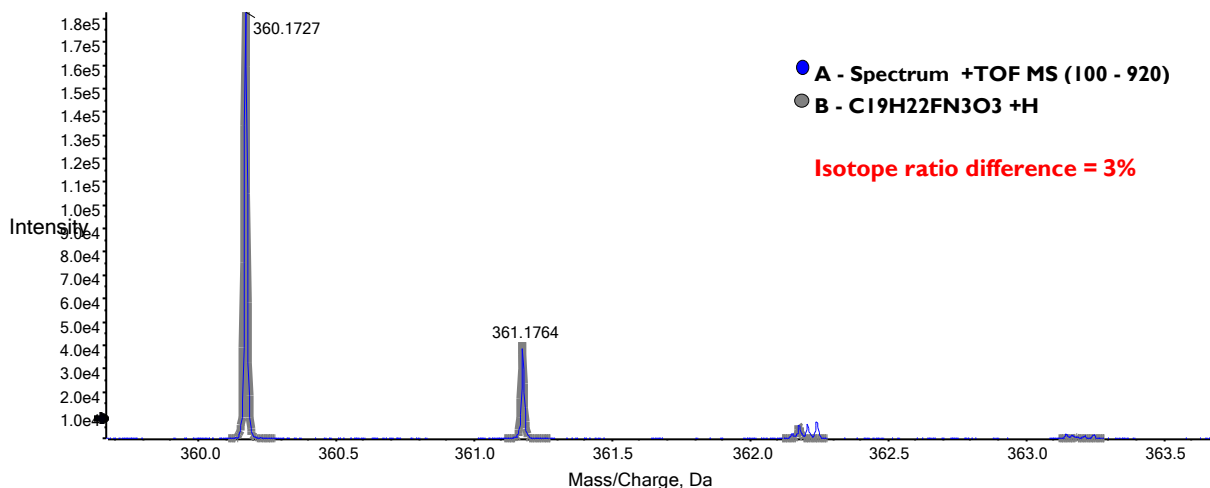


Figura 16 – Sobreposição da razão isotópica: padrão teórico e real numa amostra de fígado de leitão ao nível do LMR para a enrofloxacin.

5.3.4 Seletividade/ Especificidade/ Aplicabilidade

Através da análise às 20 amostras brancas analisadas para este parâmetro, comprovou-se a inexistência de qualquer interferente que pudesse comprometer a identificação inequívoca de todos os 45 antibióticos analisados. Neste procedimento experimental, foi também introduzido a variação da espécie animal, de forma a comprovar a aplicabilidade do método. A inexistência de interferentes foi constatada para todas as 20 amostras.

5.3.5 Veracidade/Recuperação

Tal como mencionado anteriormente, não foi possível proceder à determinação da veracidade, devido à inexistência de materiais de referência. Conseqüentemente, procedeu-se ao cálculo da recuperação para cada composto. A recuperação foi calculada através da Equação 6, com amostras fortificadas ao nível do LMR, para as concentrações: 0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR, com seis réplicas para cada nível de fortificação e cada réplica por sua vez analisada em três dias distintos. A Tabela 18 apresenta os resultados da recuperação para cada um dos 45 compostos validados, compreendidos entre os 82 e os 120%, sendo que a epi-tetraciclina foi a que apresentou o valor mais baixo, 82%, e a ampicilina o valor mais elevado com 120% de taxa de recuperação.

Tabela 18 – Valores de Recuperação (%) para cada composto.

Composto	Recuperação (%)
Ampicilina	120
Ácido Nalidíxico	111
Ácido Oxolínico	99
Benzilpenicilina (penG)	109
Cefalonium	102
Cefaperazona	93
Cefapirina	94
Cefazolina	109
Cefquinoma	102
Ceftiofur	103
Cinoxacina	92
Ciprofloxacina	101
Clorotetraciclina	94
Danofloxacina	104

Dicloxacilina	97
Doxiciclina	102
Enoxacina	95
Enrofloxacina	105
Epi-Clorotetraciclina	85
Epi-Tetraciclina	82
Espiramicina	95
Flumequina	103
Marbofloxacina	95
Nafcilina	100
Norfloxacina	104
Ofloxacina	99
Oxacilina	99
Oxitetraciclina	99
Sulfacloropiridazina	99
Sulfadiazina	100
Sulfadimetoxina	104
Sulfadimidina	105
Sulfadoxina	101
Sulfametiazol	104
Sulfametoxazol	102
Sulfanilamida	94
Sulfapiridina	100
Sulfaquinoxalina	101
Sulfatiazol	101
Sulfisomidina	93
Sulfisoxazol	103
Tetraciclina	99
Tilmicosina	103
Tilosina	90
Trimetoprim	97

5.3.6 Precisão: Repetibilidade e Reprodutibilidade

A repetibilidade do método foi calculada através da fortificação das amostras brancas em três níveis de fortificação (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR), tendo sido efetuadas seis réplicas para cada um dos níveis de concentração, repetidas em três dias distintos. Desta forma, procedeu-se ao cálculo do desvio padrão e da média através da curva de calibração. A partir do valor médio foi calculado o CV que não deve ultrapassar 2/3 do valor obtido pela Equação de Horwitz, como mencionado anteriormente.

Na Tabela 19, é possível verificar os valores de repetibilidade (%) e o respetivo critério de aceitação para cada composto, onde o maior valor obtido foi para a benzilpenicilina (penG) com 21%. No entanto, para este composto, bem como para epi-clorotetraciclina e espiramicina, este parâmetro não foi respeitando, pois ultrapassou o critério de aceitação estipulado pela Equação de Horwitz. Este facto pode justificar-se, possivelmente, por estes compostos serem mais suscetíveis a efeitos matriz, causando estas variações. Contudo, os

resultantes resultados foram de acordo com o máximo aceito pela Equação de Horwitz, de acordo com o requerido pela decisão 2002/657/CE^[24].

Tabela 19 – Valores de Repetibilidade (%) e respetivo critério de aceitação para cada composto.

Composto	Repetibilidade (%)	Critério de Aceitação
Ampicilina	16	17
Ácido Nalidíxico	12	15
Ácido Oxolínico	11	14
Benzilpenicilina (penG)	21	17
Cefalonium	16	19
Cefaperazona	14	17
Cefapirina	14	19
Cefazolina	14	17
Cefquinoma	13	15
Ceftiofur	7	10
Cinoxacina	13	15
Ciprofloxacina	8	14
Clorotetraciclina	12	13
Danofloxacina	7	14
Dicloxacilina	8	13
Doxiciclina	11	13
Enoxacina	8	15
Enrofloxacina	9	14
Epi-Clorotetraciclina	20	13
Epi-Tetraciclina	8	13
Espiramicina	19	10
Flumequina	8	12
Marbofloxacina	11	14
Nafcilina	8	13
Norfloxacina	12	15
Ofloxacina	11	15
Oxacilina	7	13
Oxitetraciclina	10	13
Sulfacloropiridazina	6	15
Sulfadiazina	12	15
Sulfadimetoxina	5	15
Sulfadimidina	6	15
Sulfadoxina	12	15
Sulfametiazol	13	15
Sulfametoxazol	11	15
Sulfanilamida	12	15
Sulfapiridina	11	15
Sulfaquinoxalina	5	15
Sulfatiazol	9	15
Sulfisomidina	12	15
Sulfisoxazol	5	15
Tetraciclina	10	13
Tilmicosina	9	11
Tilosina	12	15
Trimetoprim	10	17

Para determinar a reprodutibilidade, foi aplicado o mesmo procedimento que para a repetibilidade. Deste modo, novamente, o CV não deverá exceder o valor obtido pela Equação de Horwitz. Na Tabela 20, é possível observar os valores de reprodutibilidade obtidos e respetivo critério de aceitação para todos os 45 compostos analisados. Sendo que valor mais elevado de reprodutibilidade foi também para a benzilpenicilina com 22%, bem como para a epi-clorotetraciclina. Ainda assim, para este ultimo composto (epi-clorotetraciclina) e para a espiramicina, não cumprem este critério, pois ultrapassam o CV estipulado pela Equação de Horwitz. Este fator pode ser justificado pelo facto, novamente, destes compostos serem suscetíveis a efeitos matriz, causando estas variações, onde futuramente seria interessante e importante realizar um estudo mais completo sobre os efeitos matriz para cada composto individualmente.

Os demais antibióticos analisados neste estudo, mostraram a aceitação para o critério de reprodutibilidade.

Tabela 20 – Valores de Reprodutibilidade (%) e respetivo critério de aceitação para cada composto.

Composto	Reprodutibilidade (%)	Critério de Aceitação
Ampicilina	21	25
Ácido Nalidíxico	15	26
Ácido Oxolínico	17	21
Benzilpenicilina (penG)	22	25
Cefalonium	18	29
Cefaperazona	15	25
Cefapirina	15	29
Cefazolina	16	25
Cefquinoma	16	23
Ceftiofur	8	14
Cinoxacina	16	23
Ciprofloxacina	9	20
Clorotetraciclina	15	19
Danofloxacina	7	20
Dicloxacilina	9	19
Doxiciclina	12	19
Enoxacina	10	23
Enrofloxacina	8	20
Epi-Clorotetraciclina	22	19
Epi-Tetraciclina	10	19
Espiramicina	20	14
Flumequina	10	18
Marbofloxacina	14	21

Nafcilina	8	19
Norfloxacina	15	23
Ofloxacina	14	23
Oxacilina	8	19
Oxitetraciclina	12	19
Sulfaclopiridazina	7	23
Sulfadiazina	13	23
Sulfadimetoxina	6	23
Sulfadimidina	7	23
Sulfadoxina	14	23
Sulfametiazol	16	23
Sulfametoxazol	15	23
Sulfanilamida	13	23
Sulfapiridina	13	23
Sulfaquinoxalina	6	23
Sulfatiazol	10	23
Sulfisomidina	16	23
Sulfisoxazol	8	23
Tetraciclina	11	19
Tilmicosina	10	16
Tilosina	13	23
Trimetoprim	12	25

5.3.7 Capacidade de detecção e Limite de decisão

Os valores de $CC\beta$ e $CC\alpha$, foram determinados através da análise de amostras brancas fortificadas ao nível do LMR, para o método de confirmação. O $CC\beta$ bem como o $CC\alpha$ foram avaliados para cada um dos três dias de validação. Na Tabela 21, podemos observar os valores obtidos para estes dois parâmetros para cada um dos 45 compostos validados. Estes valores foram obtidos tendo em conta os LMRs estabelecidos e o desvio padrão observado nas amostras fortificadas, por aplicação das equações 4 e 5.

Tabela 21 – Valores de $CC\beta$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e $CC\alpha$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para cada um dos compostos.

Composto	$CC\beta$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Ampicilina	91	65
Ácido Nalidíxico	1,9	1,4
Ácido Oxolínico	288	213
Benzilpenecilina (penG)	85	67
Cefalonium	18	9,1
Cefaperazona	1,6	1,1
Cefapirina	0,7	0,5
Cefazolina	9,7	7,8
Cefquinoma	147	111
Ceftiofur	3093	2286

Cinoxacina	0,2	0,1
Ciprofloxacina	255	216
Clorotetraciclina	422	307
Danofloxacina	288	251
Dicloxacilina	383	316
Doxiciclina	391	319
Enoxacina	4,4	3,2
Enrofloxacina	287	252
Epi-Clorotetraciclina	446	323
Epi-Tetraciclina	363	326
Espiramicina	2678	2104
Flumequina	634	595
Marbofloxacina	195	161
Nafcilina	385	324
Norfloxacina	13	8,2
Ofloxacina	3,1	2,1
Oxacilina	371	315
Oxitetraciclina	441	327
Sulfacloropiridazina	136	112
Sulfadiazina	153	121
Sulfadimetoxina	131	112
Sulfadimidina	155	128
Sulfadoxina	146	122
Sulfametiazol	161	129
Sulfametoxazol	147	121
Sulfanilamida	116	107
Sulfapiridina	166	125
Sulfaquinoxalina	140	122
Sulfatiazol	178	134
Sulfisomidina	138	106
Sulfisoxazol	157	120
Tetraciclina	386	313
Tilmicosina	1707	1364
Tilosina	144	105
Trimetoprim	75	62

6. Análise de amostras reais de fígado de leitão

Trinta e seis amostras de fígado de leitão da região da Bairrada, foram recolhidas entre novembro de 2018 a fevereiro de 2019 e analisadas pela metodologia analítica já validada UHPLC-ToF-MS. Para a primeira colheita de amostras correspondente ao mês de novembro foram analisadas 15 amostras (Amostra I-15). Para a segunda colheita de amostras correspondente ao mês de fevereiro foram analisadas 21 amostras (Amostra A-V), perfazendo um total de 36 amostras analisadas.

Nas Tabelas 22 e 23 são apresentados os resultados das amostras analisadas, bem como os respetivos LMR.

Podemos observar que para a primeira colheita de amostras, realizada em novembro de 2018, todas as 15 amostras continham resíduos de antibióticos, sendo de realçar que numa

das amostras analisadas foram detetados 9 resíduos de antibióticos diferentes, enquanto em quatro das amostras foram identificados 4 resíduos, sendo que 3 das amostras apresentaram só um resíduo de antibiótico (Figura 17).

Na segunda colheita de amostras, realizada em fevereiro de 2019, os resíduos de antibióticos foram encontrados em cerca de 47% nas 21 amostras analisadas, onde dez delas não continham nenhum tipo de resíduo de antibiótico, sete amostras continham resíduos de apenas um antibiótico e quatro amostras continham resíduos de dois antibióticos diferentes (Figura 18).

Este facto pode dever-se, por exemplo, à época do ano em questão, ao produtor, à falta de consulta de um médico veterinário, bem como a dosagem distinta de antibióticos administrada aos animais cujos fígados foram analisados.

Os antibióticos encontrados em mais abundância nas 36 amostras reais analisadas foram a enrofloxacina, pertencente à família das quinolonas, sendo este composto detetado em 22 amostras, a tilmicosina, pertencente à família dos macrólidos, detetada em 10 amostras, e a danofloxacina, da família das tetraciclina, detetada em 9 das amostras.

Em relação às 7 famílias de antibióticos estudadas, nas amostras reais foram encontradas 3 famílias de antibióticos: Quinolonas, onde foram identificados 9 resíduos de antibióticos pertencentes (enrofloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, flumequina, ofloxacina, norfloxacina, ácido oxolínico, marbofloxacina e cinoxacina); Macrólidos, onde foram observados 2 resíduos pertencentes a essa família (tilmicosina e espiramicina) e Tetraciclina, onde foram observados dois resíduos de antibióticos (oxitetraciclina e doxiciclina) (Figura 19). E estas famílias de antibióticos estão entre as mais utilizadas para o tratamento de infeções em suínos, pelo que não é de estranhar que tenham sido as mais detetadas.

Contudo, é importante salientar que todos esses resíduos de antibióticos foram encontrados em concentrações mínimas, não excedendo o nível de LMR estabelecido pelo Regulamento n.º 37/2010 da Comissão Europeia^[23].

Ainda assim, torna-se relevante referir, pela positiva, que nenhum resíduo de antibiótico encontrado nas amostras reais estudadas pertence às substâncias proibidas. Alguns antibióticos encontrados, pertencentes à família das Quinolonas, nomeadamente a ofloxacina, norfloxacina e cinoxacina, não possuem um LMR estabelecido nesse mesmo regulamento, o que nos indica que os produtores de suínos, de onde foram colhidos os fígados analisados, utilizaram quer antibióticos com LMR estabelecido, quer sem LMR estabelecido pelo regulamento n.º37/2010/CE, mas nunca antibióticos proibidos.

Tabela 22 – Concentração dos resíduos de antibióticos nas 15 amostras colhidas em novembro de 2018, e respetivo LMR.

Amostra	Composto	Concentração (µg/kg)	LMR (µg/kg)
Amostra 1	Enrofloxacina	2,3	200
	Tilmicosina	35,1	1000
Amostra 2	Ciprofloxacina	8,7	200
	Danofloxacina	12,6	200
	Enrofloxacina	1,7	200
	Flumequina	52,1	500
	Ofloxacina	12,2	Não estabelecido
	Espiramicina	2,7	2000
	Tilmicosina	34,9	1000
Amostra 3	Ciprofloxacina	14,6	200
	Danofloxacina	28,5	200
	Enrofloxacina	14,6	200
	Flumequina	52,5	200
	Norfloxacina	15,8	Não estabelecido
	Ofloxacina	18,7	Não estabelecido
	Ácido Oxolínico	17,9	150
	Espiramicina	107,3	2000
Tilmicosina	95,9	1000	
Amostra 4	Ciprofloxacina	9,2	200
	Danofloxacina	14,4	200
	Enrofloxacina	3,6	200
	Espiramicina	13,7	2000
	Tilmicosina	39,8	1000
Amostra 5	Danofloxacina	15,2	200
	Enrofloxacina	5,0	200
	Espiramicina	60,0	2000
	Tilmicosina	80,0	1000
Amostra 6	Danofloxacina	12,2	200
	Enrofloxacina	3,1	200
	Tilmicosina	35,3	1000
Amostra 7	Danofloxacina	14,0	200
	Enrofloxacina	3,7	200
	Espiramicina	17,2	2000
	Tilmicosina	40,4	1000
Amostra 8	Enrofloxacina	1,5	200
Amostra 9	Enrofloxacina	0,8	200
Amostra 10	Danofloxacina	0,7	200
	Enrofloxacina	1,5	200
	Espiramicina	34,1	2000
	Tilmicosina	7,8	1000
Amostra 11	Ciprofloxacina	3,3	200
	Danofloxacina	3,1	200
	Doxiciclina	7,8	300
	Enrofloxacina	2,9	200
	Marbofloxacina	1,2	150
	Oxitetraciclina	108,0	300
	Espiramicina	33,2	2000
Tilmicosina	3,7	1000	
Amostra 12	Danofloxacina	0,9	200
	Enrofloxacina	2,1	200

	Marbofloxacin	0,8	150
	Oxitetraciclina	89,1	300
	Espiramicina	31,5	2000
	Tilmicosina	1,6	1000
Amostra 13	Cinoxacina	0,7	Não estabelecido
	Enrofloxacin	1,6	200
	Oxitetraciclina	82,3	300
Amostra 14	Oxitetraciclina	59,3	300
	Cinoxacina	2,1	Não estabelecido
Amostra 15	Enrofloxacin	1,9	200
	Ácido Oxolínico	0,8	150
	Oxitetraciclina	69,7	300

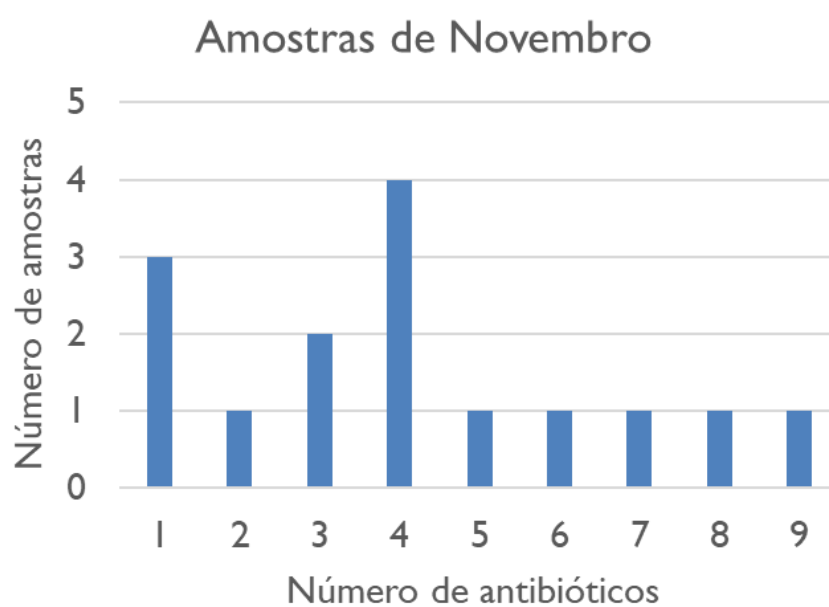


Figura 17 – Número de antibióticos observados nas 15 amostras reais de fígado de leitão, colhidas em novembro de 2018.

Tabela 23 – Concentração dos resíduos de antibióticos para as 21 amostras colhidas em fevereiro de 2019, e respetivo LMR.

Amostra	Composto	Concentração (µg/kg)	LMR (µg/kg)
Amostra A			
Amostra B	Doxiciclina	1,2	300
Amostra C	Doxiciclina	1,7	300
Amostra D			
Amostra E			
Amostra F			
Amostra G			
Amostra H			
Amostra I			
Amostra J	Enrofloxacina	2,8	200
Amostra L	Enrofloxacina	5,0	200
Amostra M	Ácido Oxolínico	5,7	150
	Enrofloxacina	1,0	200
Amostra N			
Amostra O	Doxiciclina	3,3	300
Amostra P			
Amostra Q	Ciprofloxacina	9,6	200
	Enrofloxacina	21,6	200
Amostra R	Ciprofloxacina	4,7	200
	Enrofloxacina	0,4	200
Amostra S			
Amostra T	Enrofloxacina	3,2	200
Amostra U	Ácido Oxolínico	0,3	150
	Enrofloxacina	2,8	200
Amostra V	Enrofloxacina	3,7	200

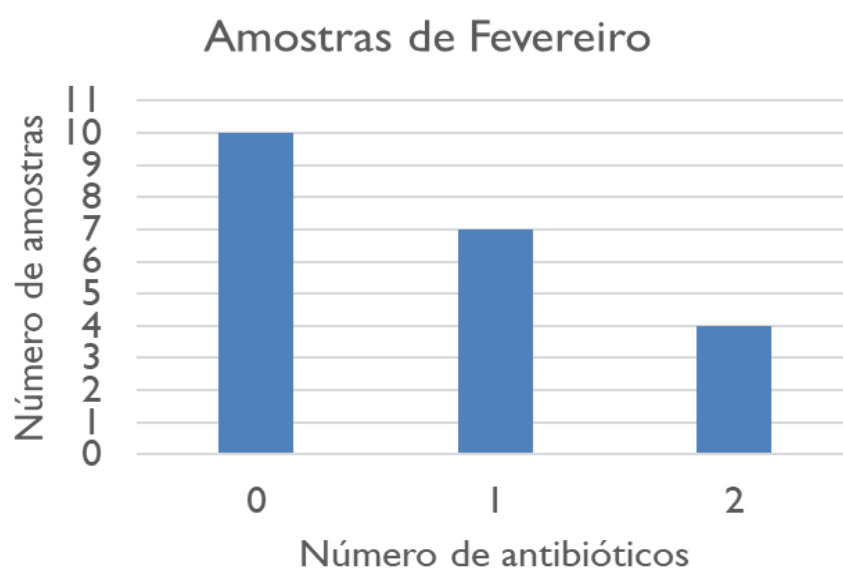


Figura 18 - Número de antibióticos observados nas 21 amostras reais de fígado de leitão, colhidas em fevereiro de 2019.

Resíduos de antibióticos presentes nas 36 amostras estudadas

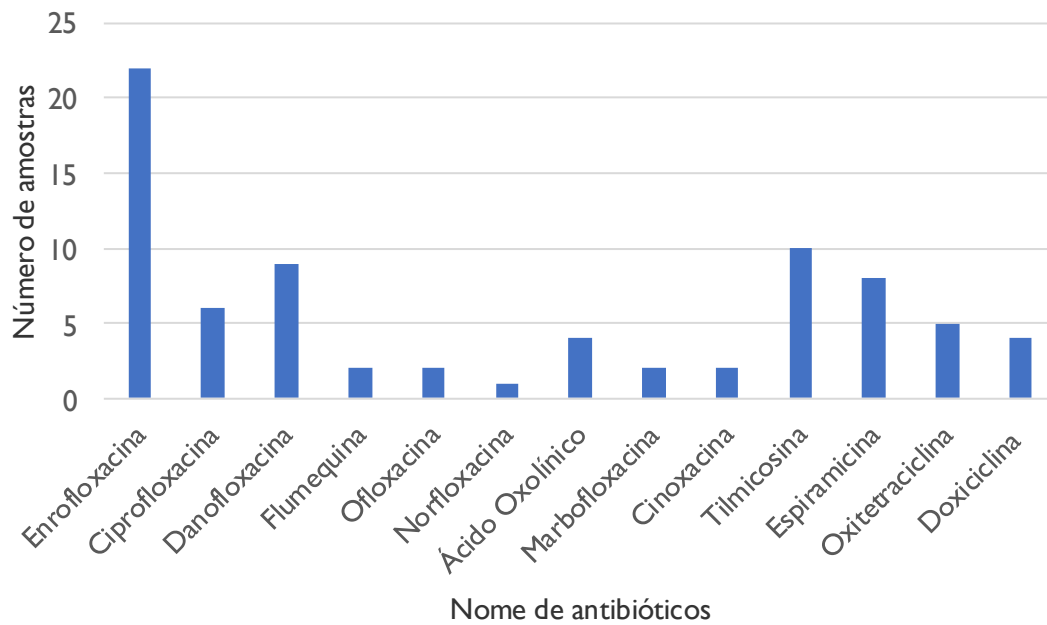


Figura 19 – Resíduos de antibióticos presentes nas 36 amostras reais analisadas, em fígado de leitão.

7. Conclusões e perspectivas futuras

O método analítico desenvolvido neste trabalho experimental, para a deteção, identificação e quantificação de 45 antibióticos em fígado de leitão proveniente da região da Bairrada evidenciou cumprir todos os parâmetros estabelecidos na Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de agosto de 2002^[24]. Contudo, apenas para o parâmetro de repetibilidade, o epímero *epi*-clorotetraciclina, benzilpenicilina (penG) e espiramicina, não demonstraram a aceitação deste critério, e para a reprodutibilidade, também a *epi*-clorotetraciclina e espiramicina não cumpriram este critério. Esta facto pode dever-se, provavelmente, pela biotransformação ao longo de todo o procedimento experimental do epímero em outro composto distinto, bem como, pela suscetibilidade destes compostos a efeitos matriz, causando estas oscilações, sendo necessário fazer um estudo mais completo sobre os efeitos matriz em cada composto individualmente.

Atendendo aos resultados obtidos no processo de validação, pode facilmente antever-se que esta metodologia é adequada para utilização em laboratórios de rotina para pesquisa e confirmação da presença de resíduos de antibióticos, e quiçá de outros medicamentos veterinários, em alimentos de origem animal. A metodologia ToF-MS, neste estudo, demonstrou inúmeras vantagens, sendo inequívoca na identificação simultânea dos antibióticos pesquisados, confirmando ser uma importante ferramenta analítica não só para métodos de triagem, mas também para propósitos confirmatórios, podendo colmatar a falta de regulamentação existente.

Por outro lado, a análise das amostras reais evidenciou a presença residual de vários dos antibióticos pesquisados neste trabalho. Entre as 36 amostras, as 15 colhidas em novembro de 2018 apresentaram um pior cenário, quando comparadas com as 21 amostras posteriormente analisadas, colhidas em fevereiro de 2019. Este facto pode ter ficado a dever-se a inúmeros fatores, nomeadamente, a diferente época do ano, ao produtor, a falta de um médico veterinário ou, mesmo, a dosagem distinta de antibióticos administrada aos animais em estudo. Importa, também, equacionar se a administração foi efetuada através de “cocktails” de antibióticos de uma só vez ou se os mesmos foram adicionados sequencialmente, tendo em atenção que o primeiro poderia não ter sido eficaz, havendo necessidade de administrar um segundo ou até um terceiro ou um quarto. Já para a presença de mais de quatro antibióticos nas amostras colhidas em novembro de 2018 não parece existir uma hipótese adequada que não seja um total desrespeito pelas boas práticas veterinárias.

Ainda assim, é de extrema importância ressaltar, que nas 36 amostras estudadas não foi encontrado nenhum antibiótico que ultrapassasse o LMR estipulado pelo Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009^[23], quando estabelecido. Poder-se-ia então considerar que, sobretudo as amostras colhidas em fevereiro de 2019, não constituem um risco para o consumidor, embora a presença simultânea de dois ou mais antibióticos na mesma amostra possa levantar questões adicionais de segurança, uma vez que o LMR de cada substância é estabelecido de forma individual. Ora, considerando que não há dados disponíveis sobre possíveis efeitos cumulativos, ou mesmo de potencial sinergismo/antagonismo, de dois ou mais antibióticos quando presentes simultaneamente num alimento de origem animal, será avisado equacionar a realização de estudos adicionais que incluam especificamente este assunto de forma a que, também no quadro legal referente aos LMRs de substâncias em tecidos edíveis, seja prevista esta hipótese.

Também, e atendendo a que os efeitos do processamento culinário comum (cozer, fritar ou assar, por exemplo) não se encontram ainda devidamente estudados, nomeadamente quanto ao potencial aparecimento de produtos de degradação resultantes da ação da temperatura utilizada nesses procedimentos, seria relevante, também relevante que tal pudesse ser conhecido, de forma a proteger a saúde do consumidor.

Finalmente, a disseminação de determinantes da resistência antimicrobiana^[39], a ocorrência de reações alérgicas e/ou tóxicas em indivíduos hipersensíveis e o impacto ambiental causado pelo uso dos antibióticos^[40] constituem hoje preocupações importantes.

Assim, a utilização de antibióticos na produção animal, e da suinicultura em particular, deve ser monitorizado e minimizado através das boas práticas agrícolas e veterinárias, de forma a proporcionar um ambiente higiénico aos animais durante a sua vida. Alternativas à utilização de antibióticos, como uso de vacinas, probióticos, prebióticos ou mesmo de agentes antimicrobianos naturais estão já na ordem do dia e devem ser encorajadas.

Em jeito de conclusão para este estudo, um tópico interessante seria, por exemplo, fazer a pesquisa de resíduos de antibióticos em fígado e rim dos mesmos leitões, tendo em atenção que a farmacocinética dos antibióticos em causa se faz de forma diferente, pelo que face aos resultados que viessem a ser obtidos seria mais fácil fazer a avaliação de risco para o consumidor das chamadas miudezas de leitão. Também, a validação de um método multi-resíduo para a determinação de resíduos de antibióticos em rim de leitão com a extensão para um maior número de antibióticos, bem como a avaliação das determinantes de resistências nas fezes desses leitões não deixarai de constituir um importante contributo para a segurança alimentar.

8. Referências Bibliográficas

- [1] – Instituto Nacional de Estatística (2017). *Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016*. (Acedido a: 08/05/2018) Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=289818234&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt.
- [2] – Instituto Nacional de Estatística (2017). *Consumo humano de carne em Portugal em 2018*. (Acedido em: 08/05/2018) Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000210&contexto=bd&selTab=tab2.
- [3] - MARILENA, E. [et al.] (2015) – Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatograph-tandem mass spectrometry. “Analytica Chimica Acta” 880 (2015) 103-121.
- [4] – EUROPEAN MEDICINES AGENCY, Sales of veterinary agents in 30 European countries in 2016 - Trends from 2010 to 2016. Eighth ESVAC report (2018) 2315-1455.
- [5] – EUROPEAN COMMISSION, The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA Journal (2019) 17 (2):5598.
- [6] – CODEX ALIMENTARIUS, Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Program for Control of Veterinary Drug Residues in Foods, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy 1993.
- [7] - ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. General Principles for Evaluating the Human Food Safety of New Animal Drugs Used in Food-Producing Animals. Guidance for Industry. June 2018.
- [8] – COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC, On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animals products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. Off.J.Eur.Communities (1996) L125/10.

- [9] – REIG, M. [et al.] (2007) – Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. "Meat Science" 78 (2008) 60-67.
- [10] – MICHALOVA, E. [et al.] (2004) – Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. "Vet. Med" 49 (3): 79-100.
- [11] – FREITAS, A. [et al.] (2013). Liquid Chromatography: Review on the last developments on the detection of antibiotics in food-producing animals. "Nova Science Publishers, Inc." (2013) 99-139.
- [12] – BERRADA, H. (2007) – Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in live rind kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/654/EC. "Journal of Chromatography A" 1157 (2007) 281-288.
- [13] – MCGLINCHEY, T.A. [et al.] (2008). A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. "Anal. Chim. Acta", 624, 1-15.
- [14] – Wang, J. (2009). Analysis of Macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. "Mass Spectrom. Rev.", 28, 50-92.
- [15] – SANTOS, L., & Ramos, F. (2016) - Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. "Trends in Food Science & Technology", 52, 16–30.
- [16] – Wang, S. [et al.] (2006). Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. "Food Additives & Contaminants" 23 (4) 362—384.
- [17] – Zhang, H. [et al.] (2009). Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Pharm.Biomed. Anal., 49, 367-374.

[18] – Mastovska, K., [et al.] (2008). Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. “Journal of Chromatography A”, 1202, 118-123.

[19] – LOUREIRO, J.R. [et al.] (2016) – O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. “Revista portuguesa de saúde pública” 34[1] (2016) 77-84.

[20] – ANVISA, (2007) - Modelo3: Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto Clínico (Pesquisado a: 09/05/2018) Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm.

[21] – CASTANHEIRA, B. (2013). *Mecanismos de Resistência a Antibióticos*. Monografia de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. 57 pp.

[22] – FREITAS, A. [et al.] (2014) - Multidetecção de antibióticos em tecido de fígado por ultra-alta pressão-liquido-cromatografia-tandem mass spectrometry. “Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences” 976-977 (2015) 49-54.

[23] – EUROPEAN COMMISSION, Commission Regulation (EC) 37/2010, of 22 December 2009, on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off.J.Eur.Communities L15 (2010) 1-72.

[24] – EUROPEAN COMMISSION, European Commission Decision 2002/657/EC, of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off.J.Eur.Communities L221 (2002) 8-36.

[25] – COMISSÃO EUROPEIA, Decisão da Comissão 98/179/CE de 23 de Fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. L65/31 (1998).

[26] – INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO (2018) – Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025:2018. OGC001.

[27] – EUROPEAN COMMISSION, Regulation (EC) N° 470/2009 of the European Parliament and of the Council, of 6 May 2009, laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, Off.J.Eur.Communities L152 (2009) 11-22.

[28] – KAUFMANN, A. [et al.] (2008) – Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2µm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. “Journal of Chromatography A” 1194 (2008) 66-79.

[29] – ORTELLI, D. [et al.] (2009) – Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. “Journal of Chromatography B” 877 (2009) 2363-2374.

[30] – STOLKER, A., [et al.] (2008) – Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. “Anal Bioanal Chem” 391: 2309-2322.

[31] – WANG, J. [et al.] (2012). The challenges of developing a generic extraction procedure to analyse multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. “Drug Testing and Analysis” 4 (1) 103-111.

[32] – ZHANG, Y. [et al.] (2015). Multi-class, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. “Journal of Dairy Science” 98 (12).

[33] – DASENAKI, E. M. [et al.]. Qualitative Multiresidue Screening Method for 143 Veterinary Drugs and Pharmaceuticals in Milk and Fish Tissue Using Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. “Journal of Agricultural and Food Chemistry” 63, 4493-4508.

[34] – GASPAR, A.F. [et al.]. Development and validation of a multi-residue and multi-class screening method of 44 antibiotics in salmon (*Salmo salar*) using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry: application to farmed salmon. *Journal of Chromatography B*. 1118–1119 (2019) 78–84.

[35] – FREITAS, A. [et al.] (2015) – Matrix Effects in Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Antibiotic Multi-Detection Methods in Food Products with Animal Origins. “Food Anal, Methods” 9 (2016) 23-29.

[36] – FREITAS, A. [et al.] – Avaliação do desempenho de métodos analíticos de pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal: Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β). “Acta Farmacêutica Portuguesa” Vol. II N $^{\circ}$ 1.

[37] – ÖTLES, S., KARTAL, C. (2016) - Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. “Acta Sci Pol Technol Aliment.”15(1):5-15.

[38] – ALKARAWI, D. (2016). The investigation of the electrical control of hemimicelles and admicelles on gold for analyte preconcentration. Thesis for Master of Science In Chemistry. 67 pp.

[39] – SANTOS, L, Ramos F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. “Int J Antimicrob Agents”. 52:135–143.

[40] – CABELLO, F. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. “J Appl Environ Microbiol”. 8(7):1137–1144.