

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS FARMACOCINÉTICOS DE RESÍDUOS DE  
FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE  
FRANGOS DE CORTE***

**FABIANO BARRETO**

Porto Alegre, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS FARMACOCINÉTICOS DE RESÍDUOS DE  
FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE  
FRANGOS DE CORTE***

Tese apresentada por **FABIANO BARRETO**  
para a obtenção de TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.09.2014, pela Banca Examinadora Constituída por:

Profa. Dr. Bibiana Verlindo de Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Tânia Mara Pizzolato  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Eliane Dallegrove  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Barreto, Fabiano  
Identificação de perfis farmacocinéticos de  
resíduos de fármacos antimicrobianos utilizados na  
produção de frangos de corte / Fabiano Barreto. --  
2014.  
166 f.

Orientador: Teresa Dalla Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2014.

1. Antimicrobianos. 2. Farmacocinética. 3.  
Resíduos de Medicamentos Veterinários. 4. LC-MS/MS.  
I. Dalla Costa, Teresa, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM) do Laboratório Nacional Agropecuário/RS (LANAGRO/RS) com recursos provenientes desta Instituição.



## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Teresa Dalla Costa, pela Orientação durante a execução deste projeto, compreensão e confiança. Muito obrigado.

Aos colegas do grupo de farmacocinética da Faculdade de Farmácia.

Aos colegas do laboratório RPM pelas inestimáveis horas de trabalho, convivência e amizade.

Aos meus pais, João e Ana, pelo eterno esforço, amor e dedicação, e aos meus irmãos, pelo apoio e amizade.

À Daniela pelo amor e apoio ao longo destes anos.

Ao Felipe Kellermann Hurtado por todo apoio e generosidade em contribuir com este trabalho sem os quais não seria possível a sua conclusão.

Ao Felipe Sabóia por toda a força e disponibilidade para os trabalhos mais difíceis, nas horas mais impróprias e principalmente pelas histórias.

Ao Sr. Zenon e Joel pelos cuidados aos animais de experimentação e pela total disponibilidade em ajudar. Sem os seus préstimos não seria possível concluir este trabalho.

Às colegas Ana Ondina e Tirzá Andrade pelo inestimável (e nem sempre facilmente compreendido por mim) conhecimento técnico, prático e apoio no cuidado com os animais.

Às incontáveis pessoas que mesmo não citadas contribuíram de alguma maneira para a concretização deste projeto.





*“The task is...not so much to see what no one has yet seen; but to think what nobody has yet thought, about that which everybody sees.”*

(Erwin Schrödinger)



## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil farmacocinético para os compostos enrofloxacino (ENRO) e seu principal metabólito, ciprofloxacino (CIPRO), e cloranfenicol (CAP) em frangos de corte visando subsidiar a tomada de ações para controle de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal e a produção de materiais de referência para fins de controle de qualidade analítica. **Métodos:** Frangos machos da linhagem Cobb-Vantress foram utilizados nos experimentos para determinação da farmacocinética plasmática e níveis teciduais para os compostos ENRO/CIPRO (10 mg/kg), CAP (100 mg/kg) após administração em dose única oral e administração contínua através da água de consumo simulando as condições reais de produção. As concentrações plasmáticas e teciduais foram determinadas utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (LC-MS/MS) através de métodos desenvolvidos e validados *in house*. Análise farmacocinética não-compartimental e modelagem compartimental dos dados foram realizadas utilizando o software WinNonlin e NONMEM v.6, respectivamente. Para determinação das concentrações teciduais os animais foram sacrificados em tempos pré-definidos e amostras de plasma, músculo e fígado coletadas para os compostos ENRO/CIPRO e plasma e músculo para CAP. **Resultados e Discussão:** Três métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários incluindo diferentes compostos pertencentes às classes químicas ou terapêuticas previstas nesse projeto foram desenvolvidos utilizando LC-MS/MS com limites de quantificação (LOQ) em acordo com os propósitos de aplicação das metodologias. Além disso, métodos específicos para a análise dos compostos individuais nas amostras de plasma foram desenvolvidos para a determinação dos perfis farmacocinéticos em plasma. **Conclusões:** com base nos dados gerados foi possível implementar novas metodologias para o controle de resíduos de medicamentos veterinários relevantes na produção de aves de corte, bem como o estudo dos perfis farmacocinéticos e depleção tecidual permitiram o delineamento correto das etapas de planejamento e predição de valores encontrados em amostras experimentais. De forma complementar, os dados gerados permitirão a produção de amostras naturalmente contaminadas contendo os fármacos em questão para a

produção de materiais de referência com o objetivo de serem utilizados para controle de qualidade analítico.

**Palavras-chave:** antimicrobianos; fluorquinolonas; coccidiostáticos; farmacocinética; resíduos; enrofloxacino; ciprofloxacino; cloranfenicol.

## ABSTRACT

### **Methods Development for Determination of Fluoroquinolones, Amphenicols and Coccidiostats Vet Drugs Residues and Evaluation of Pharmacokinetic Profiles of Enrofloxacin, Ciprofloxacin and Chloramphenicol in Broiler Chickens.**

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the pharmacokinetic profile for compounds enrofloxacin (ENRO) and its major metabolite, ciprofloxacin (CIPRO), and chloramphenicol (CAP) in broilers in order to support the actions taken to vet drugs residues control in animal products and production of reference materials for purposes of analytical quality control. **Methods:** Cobb-Vantress male broilers were used in experiments to determine the plasma pharmacokinetics and tissue levels to ENRO / CIPRO (10 mg / kg) and CAP (100 mg / kg) after single oral dose administration and continuous administration compounds through drinking water simulating the production conditions. Plasma and tissue concentrations were determined using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using *in-house* developed and validated methods. The non-compartmental and compartmental pharmacokinetic data modeling was performed using WinNonlin software and NONMEM v.6, respectively. For determination of tissue concentrations, animals were sacrificed at predefined times and plasma, muscle and liver samples collected for ENRO/ CIPRO and plasma and muscle samples to CAP. **Results and Discussion:** Three mutiresidue methods for determination of veterinary drugs including compounds belonging to same chemical and therapeutic classes in this project were developed using LC-MS/MS with limits of quantification (LOQ) in accordance with the purposes of application of methodologies. Furthermore, specific for analyzing individual compounds in the plasma samples methods have been developed for determination of plasma pharmacokinetic profiles. **Conclusions:** Based on the data generated was possible to implement new methodologies for control of veterinary drug residues relevant in broiler production, as well as the study of pharmacokinetic profiles and tissue depletion allowed the correct delineation of planning and predicting values found in experimental samples. As a complement, the data generated will enable the production incurred samples

containing the drugs for production of reference materials for analytical quality control purposes.

**Keywords:** antimicrobials; fluoroquinolones; coccidiostats; pharmacokinetics; residues; enrofloxacin; ciprofloxacin; chloramphenicol.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1. Análise de risco para controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos .....	27
3.2 Controle sanitário na produção de aves de corte .....	28
3.3 Fármacos utilizados na produção de frangos de corte .....	30
3.3.1 Fluorquinolonas.....	31
3.3.2 Cloranfenicol .....	32
3.3.3 Coccidiostáticos .....	33
3.4 Metodologias analíticas para controle de resíduos de medicamentos veterinários .....	33
3.5 Materiais de referência .....	34
CAPÍTULO 1 .....	39
CAPÍTULO 2 .....	63
CAPÍTULO 3 .....	85
CAPÍTULO 4 .....	105
CAPÍTULO 5 .....	127
4.DISSCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	153
5. CONCLUSÕES.....	159
6.REFERÊNCIAS GERAIS.....	163





---

## 1. INTRODUÇÃO

---



A produção de frangos é uma atividade relevante no âmbito do agronegócio brasileiro. Atualmente o Brasil é o 3º produtor mundial de carne de frango atrás de China e EUA, respectivamente, e líder em exportações. A região sul responde por cerca de 60% da produção nacional e neste contexto cabe ressaltar que em torno de 70% da produção é destinada ao mercado interno (1).

A produção intensificada e a reconhecida performance se devem a fatores tecnológicos como melhoramento genético, pesquisa aplicada e ferramentas de manejo visando garantir as condições sanitárias adequadas. Dentro destes aspectos a utilização de medicamentos veterinários, em especial antimicrobianos com finalidade profilática ou terapêutica tem um importante papel neste modelo produtivo. Com o objetivo de garantir condições de segurança aos consumidores diferentes regulamentações são aplicadas pelos diferentes organismos envolvidos ao redor do mundo para a gestão de risco e controle adequado dos níveis de resíduos em alimentos. No intuito de controlar de forma adequada e mitigar riscos aos consumidores o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) mantém um programa de monitoramento contemplando diferentes classes de compostos e contaminantes em diferentes matrizes visando obter informações que suportem a tomada de decisões. Os níveis de ação regulatória estabelecidos pelo Brasil estão alinhados com as principais Normativas disponíveis mundialmente (2, 3).

Para esta finalidade, o conhecimento adequado acerca das características farmacocinéticas de substâncias utilizadas na produção de alimentos é fundamental para o planejamento dos controles e delinear o monitoramento dinâmico focando em compostos relevantes ou nas matrizes que possam representar o perfil de utilização de forma mais adequada e representativa. Com base nisso, a utilização de planejamento e desenvolvimento de ferramentas de controle são fundamentais para redução de custos operacionais. Obter informações a respeito do perfil farmacocinético de compostos utilizados na produção animal é extremamente relevante na busca e desenvolvimento de metodologias capazes de atender aos propósitos de controle não só sob aspectos regulatórios como também, epidemiológicos.

Especificamente na produção de aves de corte as classes de medicamentos de maior impacto e uso são os antimicrobianos e os anticoccidianos. As recentes definições de importantes gestores de risco ao redor do mundo (USDA, SANCO, etc) na direção da proibição ampla da utilização de antimicrobianos em animais de produção como promotores de crescimento em um primeiro momento tem sido um alerta para uma alteração significativa nas políticas de controle. Os relatos de aumento das notificações de resistência relacionadas a fármacos utilizados na produção animal tem servido de base técnica para a alteração de procedimentos visando questões de saúde pública e preservar a aplicabilidade desta classe essencial de fármacos (4, 5).

Para um controle efetivo sobre a segurança dos produtos oferecidos aos consumidores, uma ação integrada dentro dos sistemas produtivos é necessária. Aliar controle ao acesso, ofertar capacitação técnica para a correta utilização de antimicrobianos e outras classes de medicamentos veterinários na produção animal com suporte laboratorial e metodologias analíticas adequadas é imprescindível para atingir os objetivos pretendidos. Uma das alternativas tem sido o aumento dos autocontroles direto nas plataformas de indústrias para verificação de conformidade sendo uma saída razoável para o atendimento das amostras das quais a escala de produção nacional necessita.

No Brasil, recentemente, tem se formado uma rede de laboratórios focados no controle de resíduos e contaminantes em alimentos fazendo parte desta rede laboratórios oficiais, credenciados incluindo privados e públicos e universidades. Esse foco direcionado à área de segurança dos alimentos tem sido um importante fator no incremento nas garantias dos produtos ofertados ao consumidor. Embora, hajam ainda muitos desafios para que se possa assegurar em todos os níveis de controle o atendimento de requisitos mínimos de segurança sob a luz dos diferentes fatores que a compõem, avanços significativos já foram realizados.

O alinhamento com políticas internacionais tanto nas questões referentes aos controles diretos como a harmonização com legislações externas para a validação de métodos e verificação de conformidade tem resultado em um ganho técnico inestimável. A introdução de ferramentas e abordagens técnicas de vanguarda tem permitido que as políticas

implementadas dentro País sejam reconhecidas e atinjam o status de equivalência com os principais países ou blocos econômicos ao redor do mundo (6).

Como forma de padronização e busca por equivalência dos sistemas de controle atualmente a Norma de referência para laboratórios de ensaios é ISO/IEC 17025. Entre os principais requisitos está a aplicação de materiais de referência certificados para a as etapas de desenvolvimento, validação e implementação de métodos de ensaio. Durante as etapas de implementação os laboratórios tem tido as mesmas dificuldades no desenvolvimento de novos métodos no que tange a obtenção de materiais de referência certificados (MRCs). Tanto MRCs das áreas de química quanto aqueles produzidos em matrizes biológicas complexas, atualmente, tem a grande maioria dos provedores localizada no exterior e o fornecimento ainda é bastante restrito sendo ainda a diversidade desses. Para países não produtores em grande escala ou ainda com poucos centros direcionando esforços para este ramo de atividades, como é o caso do Brasil, as limitações tem como causa desde o custo até legislações sanitária e alfandegária obsoletas passando por condições logísticas que permitam a internalização destes materiais em condições adequadas à manutenção de suas características.

Assim, a criação de centros de produção de MRCs no País são fundamentais para a evolução rápida das ferramentas de controle. A produção de materiais de referência no Brasil reflete esforços que estão sendo realizados no fomento visando ofertar insumos representativos das matrizes de interesse para fins de validação e desenvolvimento de metodologias, comparações interlaboratoriais e controles oficiais a laboratórios prestadores de serviços públicos e privados nas mais diferentes áreas de podendo esses atuar regionalmente já que há grande carência destes insumos nos diferentes países latino-americanos.



---

## 2. OBJETIVOS

---





## **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar o perfil farmacocinético de alguns antimicrobianos utilizados na produção de frangos de corte.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar métodos analíticos por cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa em *tandem* para a quantificação de monensina, cloranfenicol, enrofloxacino e ciprofloxacino em plasma e homogeneizado de tecidos de frangos;
- Avaliar a farmacocinética plasmática e a distribuição tecidual em frangos de corte dos antimicrobianos enrofloxacino, ciprofloxacino e cloranfenicol após a administração de dose única, no alimento ou na água, seguindo padrão de utilização empregado na rotina da produção de aves de corte.



---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



### **3.1. Análise de risco para controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos**

O controle de resíduos de medicamentos veterinários nos anos recentes tem se demonstrado grande relevância e utilizado como critério técnico para a manutenção de relações comerciais entre os diferentes países. Diferentes fatores são considerados para avaliar a segurança da utilização de medicamentos veterinários em animais de produção sendo preponderante os aspectos toxicológicos. Para definição de critérios e políticas para a correta análise de risco e ampla implementação de ferramentas para as diferentes etapas que a compreendem, incluindo a gestão de risco, diferentes organismos internacionais atuam para publicar e harmonizar legislações visando assegurar a segurança dos consumidores, meio ambiente e equivalência no âmbito do comércio internacional.

Dentre as principais entidades envolvidas encontram-se os órgãos ligados à comunidade europeia (EMA), Estados Unidos (FDA) e o Codex Alimentarius. O Codex Alimentarius é um fórum internacional de normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), por ato da Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS). Criado em 1963, o fórum tem a finalidade de proteger a saúde dos consumidores e assegurar práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos (7).

As normas Codex abrangem os principais alimentos, sejam estes processados, semiprocessados ou crus. Também tratam de substâncias e produtos usados na elaboração de alimentos. Suas diretrizes referem-se aos aspectos de higiene e propriedades nutricionais dos alimentos, abrangendo código de prática e normas para aditivos alimentares, pesticidas, resíduos de medicamentos veterinários, substâncias contaminantes, rotulagem, classificação, métodos de amostragem e análise de riscos.

O Comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB) tem como principal atividade a participação e a defesa dos interesses nacionais nos comitês internacionais do Codex Alimentarius. Tem ainda, a responsabilidade de observar as normas Codex como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos.

O comitê brasileiro é composto por entidades privadas e órgãos públicos tais como os institutos nacionais de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) e Defesa do Consumidor (IDEC); os ministérios das Relações Exteriores (MRE), Saúde (MS), Fazenda (MF), Ciência e Tecnologia (MCT), Justiça (MJ/DPC) e Desenvolvimento, Indústria e Comércio (MDIC/SECEX); as associações brasileiras da Indústria e Alimentação (ABIA) e de Normas Técnicas (ABNT); e das confederações nacionais da Indústria (CNI), Agricultura (CNA) e Comércio (CNC).

### **3.2 Controle sanitário na produção de aves de corte**

A produção de aves de corte apresenta elevado grau de desempenho e produtividade decorrente de investimento significativo em pesquisa (8). Dentre os fatores envolvidos estão condições de melhoramento genético das espécies seguidas de melhoria nas condições de manejo. Atualmente, em granjas comerciais é padrão cerca de 20.000 animais em um galpão de 1.200 m<sup>2</sup> o que demonstra a necessidade de controle das condições sanitárias de forma bastante rígida. Neste processo de aumento da produtividade seguida da redução de custos a introdução dos medicamentos veterinários como ferramenta de manejo foi imprescindível (8). Segundo relatório anual da União Brasileira de Avicultura (ABEF), 69,8% da produção nacional de carne de frango é destinada ao mercado interno sendo o restante destinado à exportação. É possível verificar a importância do controle adequado sobre a produção referente ao impacto direto sobre a população (1).

Recentemente, a preocupação expressa pelos diferentes gestores de risco ao redor do mundo tem indicado a tendência de racionalização do uso deste tipo de fármaco, como também, sinalizado com a proibição dos mesmos em animais de produção. Embora não seja objeto de consenso, há o entendimento de que a racionalização e a restrição de uso e acesso aos antimicrobianos são passos fundamentais para o controle adequado dos níveis de resíduos e casos de existência bacteriana (9).

Ao menos nos últimos 15 anos tem aumentado significativamente o número de publicações correlacionando o aumento de casos de cepas

resistentes identificadas em pacientes e a utilização de antimicrobianos em animais de produção, tendo o alimento como vetor para esta transmissão. A situação é bastante preocupante uma vez que casos de resistência incluem antimicrobianos tratados como de reserva na terapêutica humana, onde se pode citar o exemplo da vancomicina (10-12). Trabalhos têm demonstrado o impacto e as alternativas em países ou blocos econômicos onde a proibição de uso foi adotada e as perspectivas (4, 5, 9). O principal problema decorre do modelo de produção intensificada sendo que a supressão do uso profilático tem ocasionado um aumento significativo do uso para tratamento.

Na produção de aves de corte o modelo predominante adotado no Brasil envolve o sistema integrado de produção (8). Neste sistema, há entre o produtor e a empresa integradora uma parceria, sendo a última responsável pelo fornecimento dos animais, insumos e assistência técnica e o produtor participa com a estrutura física e mão de obra. Nesta situação é possível obter um nível adequado de rastreabilidade e controle sobre a produção incluindo lista de fármacos autorizados, a utilização nos lotes e os respectivos períodos de carência adotados. No entanto, embora seja possível verificar um nível mínimo de rastreabilidade, é possível identificar falhas quando avaliadas as ocorrências de amostras violadas ou seja, amostras com níveis acima do permitido pela legislação ou ainda amostras positivas para compostos não permitidos, em análise de monitoramento (13). Desta forma, a introdução de controles nos diferentes pontos da cadeia produtiva é fundamental para evitar que um produto fora de conformidade seja disponibilizado ao consumidor independente de qual etapa do controle tenha falhado.

Devido a grande densidade de animais por m<sup>2</sup> a probabilidade de disseminação de qualquer patógeno é elevada e acelerada com impactos significativos sobre produtividade, mortalidade e custos de produção. Levando em consideração esta afirmação é possível perceber que o uso não permitido pode ser realizado visando contornar uma situação de crise. Relatório recente do Wageningen UR Livestock Research visando obter um panorama referente à produção de aves e suínos no Brasil focando nas questões ligadas às exportações destas commodities para a Holanda apontou os seguintes achados (14):

- a. Não existem informações disponíveis ou confiáveis sobre a utilização de antibióticos na produção brasileira de aves e suínos
- b. Antibióticos com a finalidade de uso como promotores de crescimento ainda são comuns no Brasil.
- c. Baseado nas estimativas, o uso de antibióticos com finalidade terapêutica na produção de aves de corte no Brasil é, em média, menor que aquele registrado na Holanda. Para a produção de suínos não existem dados estimativos

Assim, algumas questões relevantes são apontadas. A ausência de controle rígido pelas autoridades competentes nos diferentes níveis é um problema grave visando enfrentar de forma adequada os riscos decorrentes da utilização de antibióticos. É imprescindível a adoção de política similar à aquisição de antibióticos de uso humano na área veterinária.

Ainda são utilizados fármacos com a finalidade de promotores de crescimento principalmente aqueles que apresentam baixa absorção no trato gastrointestinal, como é o caso da bacitracina. A última constatação é a que já havia sido levantada por alguns pesquisadores onde a retirada de fármacos utilizados de forma profilática acarreta no incremento do uso para de tratamento. A proporção em quantidades absolutas entre os dois usos não foi estabelecida.

### **3.3 Fármacos utilizados na produção de frangos de corte**

Conforme avaliação de relatórios sanitários disponibilizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do MAPA dentro de alguns estabelecimentos é possível verificar quais são as patologias de maior incidência, esquemas terapêuticos e compostos utilizados. Dentre as principais patologias estão as respiratórias e as do trato gastrointestinal (TGI). Segundo levantamentos equivalentes realizados por diferentes organismos de controle o perfil de utilização de antimicrobianos é bastante similar nas diferentes regiões produtoras de aves ao redor do mundo (9).

Conforme citado anteriormente, a utilização de fármacos na produção de aves é uma prática comum dentro deste sistema produtivo. Destes fármacos utilizados se pode citar uma lista extensa que contempla compostos



importantes utilizados na terapêutica humana como fluorquinolonas e tetraciclinas. Observando os compostos autorizados fornecidos por empresas do setor é possível verificar a diversidade de substâncias e também as patologias clínicas mais relatadas nos relatórios sanitários.

Dentre os compostos mais relevantes na produção de frangos de corte estão os anticoccidianos e antimicrobianos para tratamento de doenças do TGI e respiratório. A utilização de compostos como enrofloxacino tem demonstrado um grande impacto devido a sua efetividade no tratamento bem como o reduzido custo. Esta situação tem se mostrado alvo de grande preocupação quando cruzados dados de resistência. Os Estados Unidos através do FDA e o Canadá através da agência Health Canada suspenderam a aprovação e a utilização de enrofloxacino em aves de corte (15).

A restrição desta política apenas para a produção de frangos de corte tem como base a forma de administração destes compostos na produção de aves é extensa a todo o lote devido à inviabilidade de tratamento individualizado.

A expansão da demanda por proteína de origem animal por países como China e Índia tem criado uma pressão constante para a manutenção e expansão dos níveis de produção. Assim, há um empasse em relação à harmonização dos protocolos frente ao mercado internacional e utilização de medicamentos veterinários.

### **3.3.1 Fluorquinolonas**

As fluorquinolonas são uma importante classe de antimicrobianos de grande relevância na produção. Atualmente pelo menos 7 compostos desta classe possuem registro no Brasil para diferentes espécies. Especificamente na produção de aves, enrofloxacino é o composto com maior importância. A indicação de uso deste composto para pelo menos sete condições clínicas, incluindo doenças respiratórias e do trato gastrointestinal (16).

Recentemente, devido a casos de resistência bacteriana o uso desta classe de compostos tem sido repensado devido às implicações sobre o impacto nos casos de resistência identificados em humanos. Desta forma, agências de gestão de risco dos EUA e Canadá tem se posicionado contra a utilização destes compostos. A agência FDA em 2005 divulgou relatório e parecer proibindo a utilização de enrofloxacino na produção de aves dentro dos

EUA (15). Outros compostos da classe como o sarafloxacino também receberam parecer negativo. O principal dado epidemiológico que suporta esta decisão está nos casos crescentes de resistência de cepas de *Campylobacter* às fluoroquinolonas em especial ao ciprofloxacino (17, 18). Segundo esses dados as infecções por *Campylobacter* resistentes ao ciprofloxacino estão entre as mais comuns tendo a diarreia e vômito como os principais sintomas. Embora em raras situações possa ter o óbito como desfecho, pode ser crítico em pacientes em situação susceptível.

### 3.3.2 Cloranfenicol

Os anfenicóis apresentam riscos de desenvolvimento de problemas sanguíneos. No entanto, devido as características estruturais dos compostos pertencentes a esta classe o cloranfenicol é o único composto banido, atualmente, praticamente, em todo o mundo (19). Quando da sua utilização esse composto era administrado através da água em concentrações entre 50-100 mg/kg de peso (20).

Buscando informações referentes a notificações de presença de resíduos de cloranfenicol em produtos de origem animal é possível identificar na plataforma de notificações RASFF da União Europeia (*Rapid Alert System for Food and Feed*) cerca de 21 notificações a partir de 2005 para pescado. Para amostras de carne de aves foi possível identificar 13 amostras com presença de cloranfenicol sendo significativa a presença em produtos oriundos da própria EU. É possível avaliar que países onde o controle é mais efetivo números inferiores de notificações são evidenciados enquanto a grande maioria continua sendo identificada a partir de países fora do bloco econômico. No Brasil a última notificação para presença de cloranfenicol ocorreu em 2011 em amostra de pescado, publicada na IN MAPA n° 07/2012.

Cabe salientar que dentro dos níveis hierárquicos de controle e defesa sanitária é possível identificar falhas de monitoramento e/ou notificação da presença deste tipo de contaminantes em níveis submetidos a menor rigor e/ou controle. Outra abordagem consiste no fato da ocorrência de uso refletir a efetividade da utilização do composto. Estes fatores são fundamentais para se buscar um sistema integrado de monitoramento, mitigando que produtos

contendo resíduos de compostos proibidos sejam oferecidos aos consumidores.

### **3.3.3 Coccidiostáticos**

Conforme já citado, as condições de produção em grande escala tornam a atividade avícola susceptível a coccidiose, doença causada pelo protozoário do gênero *Eimeria*, que se encontra entre as principais na produção de aves tendo impacto significativo na produção em termos de custos para sua prevenção e controle (21).

A utilização de coccidiostáticos é uma questão ainda passível de debate. Durante a proibição da utilização de aditivos e promotores de crescimento por parte da União Européia houve o correto entendimento de que alterar a regulamentação referente aos coccidiostáticos seria uma etapa crucial e requereria planejamento adequado. Esta poderia inclusive, se equívocos no planejamento ocorressem, inviabilizar a indústria avícola com severos impactos econômicos. Diferentes compostos apresentam autorização para uso na produção de frangos de corte. Dentre os principais podemos citar os compostos classificados como ionóforos, classe a qual pertence a monensina.

Atualmente, apesar da introdução de vacinas efetivas contra as principais cepas do agente causador da coccidiose, é possível identificar através dos dados de monitoramento o uso ainda bastante amplo de compostos desta classe. Entre os principais compostos se pode identificar a nicarbazina. Recentemente tem ocorrido uma grande preocupação por parte de agentes da EU como o controle e presença de resíduos de clopidol em carne de frango, sendo registradas 34 notificações de violações apenas 2013 (22).

## **3.4 Metodologias analíticas para controle de resíduos de medicamentos veterinários**

O controle de resíduos de medicamentos veterinários tem seguido de forma bastante clara os avanços obtidos no âmbito das tecnologias disponíveis. Desta forma, muitas das abordagens atualmente empregadas somente foram possíveis a partir da introdução de ferramentas analíticas de alto poder discriminatório e sensibilidade. Atualmente o controle de resíduos tem como

sua principal ferramenta analítica sistemas que empreguem detecção por espectrometria de massas na hifenização com cromatógrafos líquidos e gasosos (23).

A utilização de sistemas com detectores clássicos tem reduzido drasticamente, principalmente devido a requisitos de sensibilidade, necessidade de confirmação de resultados positivos, métodos multirresíduos e ganho de produtividade (24). Visando a inserção nas atividades de controle e implementação de novas metodologias em laboratórios de rotina, salienta-se que o delineamento dessas deve ser pautado pela avaliação das questões de cunho prático como capacidade de processamento de amostras permitindo atender de forma plena os propósitos com custo razoável de mercado.

A introdução de metodologias multirresíduos é uma realidade e acima de tudo uma necessidade visando redução de custos operacionais como incremento da capacidade de obter informações a partir de programas de monitoramento. A análise de compostos com características distintas em métodos multirresíduos exige características específicas dos sistemas analíticos sendo necessárias velocidades de aquisição dos dados adequadas bem como possibilidade de análise simultânea em ambos os modos de ionização (positivo/negativo).

Atualmente, o direcionamento para métodos *untarget* utilizando basicamente sistemas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com detecção por tempo voo (LC-qTOF) são uma das principais tendências devido a possibilidade de busca não direcionada de compostos e maior resolução de massa. No entanto, ainda apresentam dificuldades para compostos não permitidos com níveis de ação regulatória baixos, devido a menor sensibilidade dos sistemas (25).

### **3.5 Materiais de referência**

A busca pela harmonização com regulamentações internacionalmente aceitas gera a necessidade de utilização de ferramentas de controle de qualidade que apresentem rastreabilidade analítica adequada. Atualmente a produção de materiais de referência é bastante avançada em países da Europa, EUA e Canadá. Esses avanços obtidos são decorrentes de pesados

investimentos em estrutura para produção além do entendimento por parte de institutos privados da importância e rentabilidade na oferta destes materiais (26).

No Brasil, iniciativas recentes com a mesma finalidade tem buscado fomentar que instituições públicas e privadas atuem na produção de materiais de referencia que possam ser utilizados para controle de qualidade e desenvolvimento de metodologias. Pode ser citado o INMETRO como um dos principais produtores de materiais de referencia certificados no Brasil, o que está em acordo com as suas atribuições de órgão metrológico oficial.

No entanto, a disponibilidade de materiais por parte destes organismos ainda se refere em grande parte a ensaios focados em atividades industriais ou ciência dos materiais e combustíveis. Ensaios voltados para as áreas de diagnóstico e sanidade animal ainda são bastante restritos ou funcionando apenas como comparações interlaboratoriais.

Dentro das políticas da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, há o entendimento de que a rede laboratorial compreendida por laboratórios da REDE LANAGRO e laboratórios credenciados deve possuir políticas sistemáticas de controle de qualidade (27). Especificamente na REDE LANAGRO de laboratórios, definição estratégica recente dimensionou os laboratórios para a busca pela acreditação à normas internacionais específicas para as áreas de produção de materiais de referência e organização de ensaios de proficiência, ISO GUIA SÉRIE 30 e ISO/IEC 17043, respectivamente (28).

Seguindo a tendência de harmonização a protocolos internacionais o planejamento envolve que determinadas unidades trabalhem com a produção de materiais enquanto outras direcionem esforços para a organização de rodadas de ensaios de proficiência a partir dos materiais produzidos. Assim, estão em curso a acreditação à norma ISO Guia série 30 (especifica para a produção de materiais de referência) e à ISO/IEC 17043 (especifica para organizadores de ensaios de proficiência).

Dentro destas perspectivas e importância, cabe ressaltar que investimentos em aquisição de equipamentos específicos visando qualificar os processos para a produção de amostras são necessários. A introdução de ferramentas de farmacotécnica permitem que as amostras produzidas possam

ser preparadas de forma adequada para assegurar a estabilidade e homogeneidade das mesmas.

Entendendo a extensão do Brasil e tendo a perspectiva de atuar como referência dentro da América Latina, fator pretendido estrategicamente pelo MAPA, a produção de amostras que possam ser transportadas e acondicionadas por longos períodos é fundamental. Entre as formas mais práticas para remessa de materiais foi identificado que a liofilização das amostras permite a estocagem por períodos e o transporte à temperatura ambiente, o que propicia redução de custos e facilidade ao processo de distribuição.

Além disso, como a perspectiva dos materiais de referência é a utilização para rodadas de ensaios de proficiência, a liofilização é interessante para atender aos problemas logísticos encontrados na distribuição de amostras *in natura*, reduzindo o descarte das mesmas quando do envio para locais descentralizados ou de menor capacidade de transporte. A liofilização de amostras naturalmente contaminadas permite a reprodutibilidade das condições de rotina assegurando que os objetivos principais de amostras utilizadas como controle de qualidade ou em comparações interlaboratoriais sejam obtidos. A aquisição de sistemas que permitam a obtenção de moagem adequada e a caracterização de uma granulometria regular são fundamentais para a padronização dos processos.

A parte experimental deste trabalho, incluindo breve revisão de cada tema, materiais e métodos, resultados e discussão, foi dividida em cinco capítulos, sendo cada um correspondente a um artigo científico. Os artigos encontram-se na sequência do texto conforme a seguir:

- **Capítulo 1**

*High throughput method to quantify nine fluoroquinolones in muscle of different animal species by LC-MS/MS without SPE steps*

Fabiano Barreto, Cristina Ribeiro, Rodrigo Barcellos Hoff, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 2**

*A simple and high throughput method for confirmation and quantification of coccidiostats in poultry muscle and whole egg*

Fabiano Barreto, Cristina Ribeiro, Rodrigo Barcellos Hoff, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 3**

*Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography– electrospray ionization-tandem mass spectrometry*

Fabiano Barreto, Cristina Ribeiro, Rodrigo Barcellos Hoff, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 4**

*Pharmacokinetics and tissue residue depletion of chloramphenicol succinate after single and continued administration in broiler chickens*

Fabiano Barreto, Felipe Kellermann Hurtado, Felipe Saboia, Teresa Dalla Costa

- **Capítulo 5**

*Population Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin in Broiler Chickens after Single Dose and Continuous Administration through Drinking Water*

Fabiano Barreto, Felipe Kellermann Hurtado, Felipe Saboia, Teresa Dalla Costa





---

## **CAPÍTULO 1**

*High throughput method to quantify nine fluoroquinolones in muscle of different animal species by LC-MS/MS without SPE steps*

---



**High throughput method to quantify nine fluoroquinolones in muscle of different animal species by LC-MS/MS without SPE steps**

Fabiano Barreto<sup>1,2\*</sup>, Cristina Ribeiro<sup>1</sup>, Rodrigo Barcellos Hoff<sup>1</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding Author:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Estrada da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 3248 2133

Fax: 55 51 3248 2690

E-mail: [fabiano.barreto@agricultura.gov.br](mailto:fabiano.barreto@agricultura.gov.br)

## **Abstract**

This work describes a quantitative and confirmatory method to determination of nine fluoroquinolones (Nalidixic acid, oxolinic acid, flumequine, norfloxacin, enrofloxacin, difloxacin, danofloxacin, sarafloxacin and ciprofloxacin) in poultry, bovine, swine and fish muscle based-on LC-MS/MS with simple solvent extraction and clean-up procedure. The extraction procedure consists in extraction with acetonitrile 1% formic acid followed low temperature clean-up. No solid phase extraction (SPE) step was applied. The recoveries ranged between 79% and 115%. The analytes concentration range was 0-200  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The LOD and LOQ were 5 and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively. The clean-up procedures applied low temperature and centrifugation steps to obtain a purified extract. This high throughput method showed reliable for identification and confirmation of nine relevant compounds in animal production. Method showed good precision and reproducibility according of acceptance criteria. Validation procedure was in according with Directive 2002/657/EC.

Keywords: LC-MS/MS, fluorquinolones, quinolones, poultry, fish, residues



---

## **CAPÍTULO 2**

*A simple and high throughput method for confirmation and quantification of coccidiostats in poultry muscle and whole egg*

---



**A simple and high throughput method for confirmation and quantification of coccidiostats in poultry muscle and whole egg**

Fabiano Barreto<sup>1,2\*</sup>, Cristina Ribeiro<sup>1</sup>, Rodrigo Barcellos Hoff<sup>1</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS

Estrada da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 3248 2133

Fax: 55 51 3248 2690

E-mail: [fabiano.barreto@agricultura.gov.br](mailto:fabiano.barreto@agricultura.gov.br)



## **Abstract**

A simple, sensitive and robust quantitative and confirmatory multi-residue method was developed for monitoring coccidiostats used in poultry production in muscle and whole eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). The compounds assayed in a single run were lasalocid A, maduramycin, monensin, narasin, salinomycin, semduramycin, decoquinate, robenidine, diclazuril, toltrazuril, trimethoprim, clopidol, amprolium, diaveridine and nicarbazin (marker residue dinitrocarbanilide - DNC). A low cost extraction and clean up procedure were tested without SPE purification steps. For sample clean up from matrixes acetonitrile extraction followed by low temperature showed reliable results. Drugs separation was conducted using a Poroshell 120 EC-C18 column and water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.025% formic acid and 1 mM of ammonium acetate as mobile phase in an elution gradient program. The total chromatographic run time was 16 min, compounds were ionized in negative and positive mode and monitored simultaneously. The method was validated in according with Commission Decision 2002/657/EC and is under routine use for control of coccidiostats residues in the Brazilian National Residue Control Plan (NRCP).

Keywords: LC-MS/MS, coccidiostats, poultry, egg, residues

---

### **CAPÍTULO 3**

*Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography– electrospray ionization-tandem mass spectrometry*

---



**Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography– electrospray ionization-tandem mass spectrometry**

Fabiano Barreto<sup>1,2\*</sup>, Cristina Ribeiro<sup>2</sup>, Rodrigo Barcellos Hoff<sup>2</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Estrada da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 3248 2133

Fax: 55 51 3248 2690

E-mail: [fabiano.barreto@agricultura.gov.br](mailto:fabiano.barreto@agricultura.gov.br)

## **Abstract**

A simple, rapid and sensitive confirmatory and quantitative method by liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS) for determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in poultry, swine, bovine and fish muscle was developed. Sample clean up was obtained with basic ethyl acetate extraction and concentration by dryness. Hexane was used to fat removal. The chromatographic separation was carried-out in XTerra C18 column with a gradient elution using water and acetonitrile both with 2 mM of ammonium acetate at flow rate of 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. The triple-quadrupole spectrometer with electrospray ionization was operated in a positive and negative polarity using the Multiple Reaction Monitoring (MRM) for each compound reaching the requirements of four identification points. Chloramphenicol-D5 (CAP-d5) was used as internal standard. The method validation was performed according to the criteria of Commission Decision 2002/657/EC.

Keywords: LC-MS/MS, amphenicols, residues, method validation, scope extension



---

## **CAPÍTULO 4**

*Pharmacokinetics and tissue residue depletion of chloramphenicol succinate after single and continued administration in broiler chickens*

---





**Pharmacokinetics and tissue residue depletion of chloramphenicol succinate after single and continued administration in broiler chickens**

Fabiano Barreto<sup>1,2</sup>, Felipe Kellermann Hurtado<sup>1</sup>, Felipe Saboia<sup>2</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

\*Correspondence:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Av. Ipiranga, 2752  
Porto Alegre – RS – 90.610-000 - Brazil  
Phone (+55 51) 3308 5418  
E-mail: [dalla.costa@ufrgs.br](mailto:dalla.costa@ufrgs.br)

## Abstract

Chloramphenicol (CAP) is a broad spectrum antimicrobial forbidden for food-producing animals. Due to its effectiveness and toxicity profile, CAP remains under control for monitoring unauthorized use. In the present study CAP pharmacokinetic profile was determined in broiler chickens after single oral dose (100 mg/kg body weight) and after a continued administration by water (500 mg/L) simulating non-permitted use on production. Both plasma and muscle samples were analyzed using liquid chromatography coupled to *tandem* mass spectrometry validated method. CAP pharmacokinetic parameters were determined by non-compartmental analysis (NCA) and population pharmacokinetic modeling. Chloramphenicol was absorbed rapidly after single oral dosing ( $t_{max} = 2.2 \pm 1.4$  h) and eliminated with a mean half-life ( $t_{1/2}$ ) of  $8.5 \pm 4.4$  h. A sustained concentration profile in plasma was observed with concentration remaining at high levels between 0.5-4 h after dosing. Plasma profiles were characteristic of a two-compartment open model. Internal model validation carried out by bootstrap analysis demonstrated the model stability and precision of estimated PK parameters. The final model applied was possible to fit the experimental data with simulated data for plasma concentration. A robust PK model for CAP in broiler chickens was demonstrated which predict adequately plasmatic concentrations. After 5 days of continued CAP administration followed by 4 days withdrawn time, it was possible to detect residues of CAP in muscle ( $5.95 \pm 2.02$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) above the analytical method Limit of Quantification (0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Keywords: LC-MS/MS, CAP, pharmacokinetics



---

## **CAPÍTULO 5**

*Population Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin in Broiler Chickens after Single Dose and Continuous Administration through Drinking Water*

---



**Population Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin in Broiler Chickens after Single Dose and Continuous Administration through Drinking Water**

Fabiano Barreto<sup>1,2</sup>, Felipe K. Hurtado<sup>1</sup>, Felipe Saboia<sup>2</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Sciences Graduate Program, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

**Running Head:** Population Pharmacokinetics of Enrofloxacin in Chicken

\*Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Pharmaceutical Sciences Graduate Program

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752 – Porto Alegre – RS – 90.610-000

Tel.: (+55) 51 3308 5418. Fax: (+55) 51 3308 5437

Email: [dalla.costa@ufrgs.br](mailto:dalla.costa@ufrgs.br)

## ABSTRACT

Enrofloxacin (ENRO) is a broad-spectrum fluoroquinolone antibiotic widely employed in poultry, fish, and cattle production to minimize bacterial outbreak caused by *Enterobacteriaceae* and other bacterial strains. Specifically in broiler poultry, ENRO residual levels are strictly monitored by regulatory agencies, which have established a maximum residue level (MRL) of 100 µg/kg of meat for human consumption expressed as sum of ENRO and its major desethyl active metabolite, ciprofloxacin (CIPRO), concentrations. The knowledge of ENRO and CIPRO pharmacokinetics in broiler poultry is important not only to determine the withdrawal period before animals slaughter but also to allow the preparation of incurred samples for proficiency testing programs. In this context, the pharmacokinetics of ENRO and its metabolite was determined in broiler chicken after single oral dose of 10 mg/kg or after adding 50 mg/L of ENRO in the animal's drinking water for 5 days (equivalent to 10 mg/kg/d). Blood samples were withdrawn up to 48 h post dosing and ENRO and CIPRO concentrations were analyzed by a validated LC-MS/MS method. Pharmacokinetic profiles of ENRO and CIPRO were simultaneously model fitted using the nonlinear mixed effects modeling approach. The integrated PK model that consists of three-linked compartments with first-order absorption, elimination from the central compartment and saturable formation of CIPRO from its parent drug adequately described the profiles of ENRO and CIPRO in broiler chickens after single oral dosing and continuous administration via the drinking water. The following parameters were estimated (10 mg/kg single p.o. dose): CL/F (0.637 L/h/kg),  $V1/F_{(ENRO)}$  (6.67 L/kg),  $k_a$  (1.92 1/h),  $V1_{(CIPRO)}$  (0.414 L/kg),  $CL_M$  (0.907 L/h/kg),  $k_M$  (2.52 mg/L), and  $V_{max}$  (0.241 µg/h). A robust PK model for ENRO and CIPRO in broiler chickens was demonstrated allowing to concentration prediction both in plasma and tissue.

**Keywords:** Enrofloxacin; Broiler chicken; Pharmacokinetics; Ciprofloxacin; Antibiotic residue; Nonlinear mixed effects modeling.

---

#### **4. Discussão Geral e Perspectivas**

---





O controle de resíduos de medicamentos veterinários é uma etapa importante na garantia de produtos seguros aos consumidores. Para atingir este objetivo a disponibilização de metodologias sensíveis e a aplicação de estudos de farmacocinética para identificação dos perfis de resíduos e identificação de novos marcadores são fundamentais. Além disso, a introdução de ferramentas de modelagem populacional visando a predição de resultados não conformes e, posteriormente, a produção de materiais de referência aparecem como um campo promissor, já que atualmente pouco é aplicado na área de controle de resíduos de medicamentos veterinários. De forma complementar, o uso de ferramentas de modelagem é imprescindível para que seja possível trabalhar de forma dinâmica os dados encontrados a partir de resultados de monitoramento.

No presente trabalho inicialmente foram definidas as metodologias analíticas para a determinação dos resíduos de medicamentos veterinários relevantes na produção de aves de corte. A busca de metodologias rápidas e sensíveis permitiu o desenvolvimento e validação de métodos em acordo com os guias vigentes implementados. Cabe salientar que além dos analitos objeto de estudos farmacocinéticos as metodologias foram desenvolvidas para atender propósitos de monitoramento e assim compreendem um número significativo de compostos para os três grupos trabalhados. Assim, os resultados gerados referentes ao desenvolvimento de metodologia para determinação de resíduos de compostos pertencentes à classe das flúorquinolonas, coccidiostáticos e anfenicóis em diferentes tecidos em diferentes tecidos geraram três capítulos desse trabalho (Capítulos 1 a 3). Todos os métodos foram validados em acordo com a Diretiva 2002/657/EC.

Para fluoroquinolonas, um método multirresíduos foi desenvolvido por LC-MS/MS para quantificação de nove fármacos (enrofloxacino, ciprofloxacino, norfloxacino, sarafloxacino, danofloxacino, difloxacino, ácido nalidíxico, ácido oxolínico e flumequina) em amostra de músculo. A preparação das amostras foi feita por extração com solvente orgânico seguido de clean-up a baixa temperatura. O escopo do método inicialmente desenvolvido para músculo de aves foi ampliado para as espécies bovino e suíno. Os limites de quantificação obtidos bem como os critérios de desempenho mostraram-se adequados para

a quantificação desses compostos tendo como base os limites regulatórios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (MAPA).

De forma similar, uma metodologia multirresíduos para a determinação de anfenicóis foi desenvolvida e validada para os compostos cloranfenicol, tianfenicol, florfenicol e florfenicol amina. O procedimento de extração com acetato de etila com 2% de hidróxido de amônio se mostrou eficiente sendo possível atingir os limites de quantificação adequados às aplicações pretendidas, atendendo aos critérios para compostos proibidos (cloranfenicol) e permitidos (demais compostos).

O método desenvolvido e validado para a determinação multirresíduos de compostos anticoccidianos permitiu a quantificação de 15 compostos (lasalocid A, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina, semduramicina, decoquinato, robenidina, diclazuril, toltrazuril, trimethoprim, clopidol, amprolium, diaveridina e dinitrocarbanilida). Devido às condições de utilização desses compostos, o método foi inicialmente validado para a matriz músculo de aves e posteriormente teve o escopo ampliado para ovos. Com uma abordagem rápida utilizado extração com acetonitrila seguida de clean-up a baixa temperatura foi possível analisar em apenas uma corrida cromatográfica compostos com características físico-química distintas. Além disso, devido ao equipamento utilizado nestes experimentos, foi possível analisar simultaneamente compostos tanto no modo positivo quanto negativo sem perda de sensibilidade ou desempenho.

A avaliação farmacocinética do enrofloxacino e seu principal metabólito, ciprofloxacino, foi realizada utilizando-se dose (10 mg/kg) aplicada nas condições usuais de produção (Capítulo 5). Os dados obtidos para o enro e ciprofloxacino em plasma foram modelados adequadamente com modelo de 2 compartimentos e formação de metabólito saturável. O fármaco foi administrado tanto pela via oral em dose única (gavagem) como através da água de beber. A modelagem permitiu determinar que a administração em dose única oral é adequada para gerar parâmetros farmacocinéticos que descrevem a disposição do fármaco mesmo quando ingerido continuamente na água de beber.

A avaliação farmacocinética do cloranfenicol (Capítulo 4), fármaco banido da produção de frango de corte, também foi realizada nas condições de uso do

fármaco (100 mg/kg/dia) e após dose única oral por gavagem. Do mesmo modo, modelo de dois compartimentos foi adequado para descrever o perfil plasmático. Na avaliação das amostras de músculo foi possível determinar que a modelagem plasmática do cloranfenicol foi capaz de prever os perfis teciduais, permitindo a previsão das concentrações residuais a partir de amostras de sangue.

Em conclusão, o trabalho permitiu vislumbrar a aplicabilidade da modelagem farmacocinética populacional para avaliação de antimicrobianos utilizados no manejo de frangos para consumo humano e a possibilidade da utilização dos modelos desenvolvidos para ampliar as inferências e dar suporte à tomada de decisões em vigilância sanitária. Além disso, as metodologias multirresíduos são ferramentas imprescindíveis para o correto controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Com os resultados obtidos nesse trabalho fica a clara a relevância da modelagem farmacocinética populacional para o monitoramento de resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal. A modelagem populacional poderá ser aplicada em estudos futuros permitindo, inclusive, a redução dos experimentos em animais a partir da geração de informações relevantes se utilizado os dados históricos das amostras de monitoramento.



---

## 5. Conclusões

---



- Metodologia multirresíduos sensível capaz de quantificar com precisão e exatidão nove fluoroquinolonas através de um procedimento simplificado de preparação de amostras aplicável a diferentes tecidos animais (músculo de aves, bovino e suínos) foi desenvolvida e validada de acordo com os limites estabelecidos pelo MAPA;
- Metodologia multirresíduos com grande capacidade de processamento de amostras permitindo analisar quinze coccidiostáticos com características físico-químicas significativamente distintas e atendendo aos diferentes limites regulatórios estabelecidos pelo MAPA foi desenvolvida e validada para as matrizes músculo de frango e ovos;
- Metodologia que permite analisar em níveis sub-partes por bilhão do fármaco cloranfenicol, proibido na produção animal, e os compostos permitidos, incluindo o principal metabólito do florfenicol, florfenicol amina foi desenvolvido e validado. O método tem execução rápida e de baixo consumo, permitindo o processamento de número significativo de amostras;
- O perfil farmacocinético plasmático e muscular do cloranfenicol foi avaliado em frangos utilizando o mesmo modo de administração utilizado na produção. Os perfis plasmáticos foram adequadamente modelados com modelo de dois compartimentos utilizando abordagem populacional. O modelo permitiu a previsão das concentrações musculares a partir dos parâmetros plasmáticos evidenciando seu potencial para utilização em vigilância sanitária;
- Os perfis farmacocinéticos plasmáticos do enrofloxacino e seu principal metabólito, ciprofloxacino, foram avaliados em condições de rotina de manejo de frangos de corte. O modelo de dois compartimentos com formação de metabólito saturável adequadamente descreveu os dados experimentais dos dois compostos simultaneamente, através da utilização de abordagem farmacocinética populacional.





---

## **6. REFERÊNCIAS GERAIS**

---



1. UBABEF. Annual Report 2010-2011 2012. Available from: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>.
2. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 17/2013, (2013).
3. Commission E. Commission Regulation N° 37/2010. Official Journal of the European Union; 2010.
4. Acar J, Casewell M, Freeman J, Friis C, Goossens H. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clinical Microbiology and Infection*. 2000;6(9):477-82.
5. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(2):159-61.
6. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, OJ L 221 (2002) 8.
7. FAO. RISK ANALYSIS IN THE CODEX COMMITTEE ON RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS. 2014.
8. EMBRAPA. Saúde 2014. Available from: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaoodeFrangodeCorte/Sanidade-aves.html>.
9. Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet J*. 2011;187(2):182-8.
10. Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 1997;31(1-2):95-112.
11. Borgen K, Sørum M, Wasteson Y, Kruse H. VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;64(1-2):89-94.
12. Pessanha RP, Gontijo Filho PP. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001;53:111-5.
13. BRASIL M. Instrução Normativa N° 07/2013. DOU: MAPA; 2013.
14. Bokma-Bakker MH, Bondt N, Neijenhuis F, Mevius DJ, Ruiter SJM. Antibiotic use in Brazilian broiler and pig production: an indication and forecast of trends. *Lelystad: Wageningen UR Livestock Research*, 2014.
15. FDA. Recalls & Withdrawals - Enrofloxacin for Poultry. 2005.
16. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet*. 1990;80(2):173-86.
17. Cody AJ, Clarke L, Bowler ICJW, Dingle KE. Ciprofloxacin-resistant campylobacteriosis in the UK. *The Lancet*. 2010;376(9757):1987.
18. Agunos A LD, Avery BP, Parmley EJ, Deckert A, Carson CA. Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in retail chicken, western Canada. *Emerg Infect Dis* [Internet]2013.
19. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 09/2003, (2003).
20. Anadon A, Bringas P, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ. Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. *J Vet Pharmacol Ther*. 1994;17(1):52-8.
21. Olejnik M, Szprengier-Juskiewicz T, Jedziniak P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(46):8141-8.
22. Commission E. RASFF Portal 2014. Available from: [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF\\_REFERENCE=2014.0116](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2014.0116).
23. Balizs G, Hewitt A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2003;492(1-2):105-31.
24. Stolker AA, Peters RJ, Zuiderent R, DiBussolo JM, Martins CP. Fully automated screening of veterinary drugs in milk by turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(7):2841-9.
25. Ortelli D, Cognard E, Jan P, Edder P. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(23):2363-74.

26. BAM. Guidelines for the Production of BAM Reference Materials 2010. Available from: [http://www.bam.de/en/fachthemen/referenzmaterialien/referenzmaterialien\\_medien/bam\\_rm\\_guidelines.pdf](http://www.bam.de/en/fachthemen/referenzmaterialien/referenzmaterialien_medien/bam_rm_guidelines.pdf).
27. BRASIL. Instrução Normativa 24. 2011.
28. ISO/IEC 17043:2010, “Conformity assessment - General requirements for proficiency testing”, International Organization for Standardization, 1<sup>st</sup> Ed. 2010.