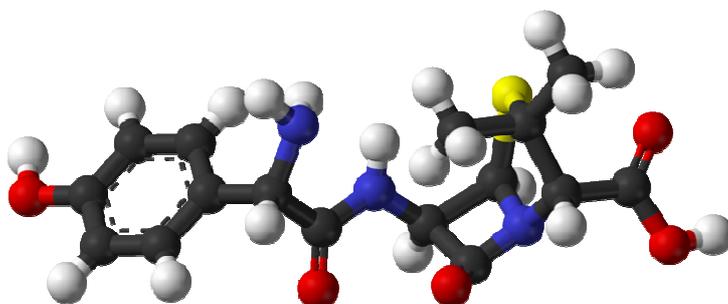




INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO
Universidade Técnica de Lisboa



**Desenvolvimento e validação de uma metodologia
analítica para a detecção e quantificação da
Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS**

Andreia Alexandra Ribeiro Freitas

Dissertação para obtenção do grau de mestre em
Química

Júri

Presidente: Prof. Doutor Pedro Paulo de Lacerda e Oliveira Santos

Orientadores: Prof.^a Doutora Maria Amélia Loureiro dos Santos Seabra
Doutor Jorge Manuel da Silva Barbosa

Vogais: Prof.^a Doutora Maria Matilde Soares Duarte Marques

Outubro de 2008

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Doutor Jorge Barbosa, pela oportunidade e pelo incentivo à execução deste mestrado, assim como por toda a disponibilidade e pelo apoio dispensado ao longo deste trabalho.

Agradeço à Prof.^a Doutora Maria Amélia Seabra pelo acompanhamento e pela ajuda dispensada, mostrando-se sempre disponível na partilha de conhecimentos.

Um agradecimento a todos os colegas que trabalham diariamente comigo no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, os quais me ajudaram na execução de toda a parte experimental, em especial à Doutora Maria da Luz Ferreira, à Eng.^a Isabel Carvalho e à D. Fernanda Tavares.

Ao meu marido, aos meus pais e à minha irmã, agradeço o apoio, o encorajamento e a compreensão incondicional que sempre me demonstraram.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado.

Resumo

A amoxicilina é um composto farmacologicamente activo com propriedades antimicrobianas, pertencente ao grupo das penicilinas. Este composto é um dos mais importantes da classe a que genericamente se dá o nome de antibióticos beta-lactâmicos. A par com outras penicilinas semi-sintéticas, a amoxicilina foi desenvolvida com o intuito de aumentar o espectro de acção antimicrobiano, tendo em conta os compostos que existiam. Eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, revela-se mais resistente ao tracto gástrico, demonstrando, portanto, uma maior absorção quando administrado por via oral, comparativamente com as penicilinas naturais. Dadas as suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, a amoxicilina é muito utilizada em medicina humana e medicina veterinária. Neste último caso, o seu uso pode ultrapassar os limites da terapêutica e chegar a ser administrada com a finalidade de promover o crescimento de animais em produção intensiva. Uma vez que a utilização deste composto, embora permitida, estando estabelecido limite máximo de resíduo (LMR) em músculo de 50 µg/kg, encontra-se sujeita a restrições, torna-se necessário controlar a sua boa aplicação por parte dos produtores, para defesa dos consumidores.

Este estudo centrou-se no desenvolvimento e na validação de uma metodologia analítica, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), para a detecção e quantificação da amoxicilina em músculo, de acordo com os critérios estabelecidos pela União Europeia. Foi igualmente efectuado um estudo de estabilidade do composto, de forma a conhecer as condições em que ocorre a sua degradação e, a partir daí, caracterizar os principais produtos assim originados.

Os objectivos propostos foram concretizados, obtendo-se um método validado de acordo com os requisitos da União Europeia. O limite de detecção (LD) do método é de 5 µg/kg e o limite de quantificação (LQ) é 8 µg/kg. Relativamente ao limite de decisão ($CC\alpha$) e à capacidade de detecção ($CC\beta$) para a amoxicilina, estes são, respectivamente, de 56 µg/kg e 67 µg/kg.

Palavras-chave: Amoxicilina, LC-MS/MS, validação

Abstract

Amoxicillin is one pharmacological active compound with antimicrobial properties, an antibiotic of the penicillin's group. This compound is one of the most important of antibiotic class usually called beta-lactams. Like the other semi-synthetic penicillins, the amoxicillin was obtained in order to get a broad – spectrum antibiotic. Effective against gram-positive and gram-negative bacteria, is more stable in the gastric tract and has high absorption when administrated orally than the natural penicillins. It's pharmacological and pharmacokinetic properties makes amoxicillin a widely used antibiotic in human and veterinary medicine.

The veterinary use can be expanded and the antibiotics can be used as growth promoters in animals used for food production. Although the use of this compound is not forbidden, with maximum residue limit established of 50 µg/kg for meat, to protect the consumers some restrictions have to be fulfilled when used by the producers.

This study was focused on the development and validation of an analytical methodology, by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), for the detection and quantification of amoxicillin in meat according to the established criteria of European Union.

A stability study of that compound was performed with the intention to understand better its degradation and characterize its main products.

The main issues were successfully treated, with the result of having now a validated method, according with EU requirements. The following limits were set: A detection limit (LD) of 5 µg/kg and a quantification limit (LQ) of 8 µg/kg. The decision limit (CC α) and the capacity of detection (CC β) obtained for amoxicillin were 56 µg/kg and 67 µg/kg.

Key-words: Amoxicillin, LC-MS/MS, validation

Índice

Agradecimentos	2
Resumo	3
Abstract	4
Índice	5
Abreviaturas	7
Índice de tabelas	8
Índice de figuras	9
1. Objectivo	11
2. Introdução	13
2.1. Medicamentos veterinários e protecção dos consumidores	13
2.2. Medicamentos antimicrobianos – as penicilinas	15
2.2.1. Alguns dados históricos	15
2.2.2. Química das penicilinas	17
2.2.3. Amoxicilina	22
2.3. Aplicação em medicina veterinária	25
2.4. Determinação analítica da amoxicilina	26
2.4.1. Extracção das amostras	27
2.4.2. Métodos de detecção	27
2.5. Validação	29
2.5.1. Limite de decisão – $CC\alpha$ – e capacidade de detecção - $CC\beta$	30
2.5.2. Veracidade	32
2.5.3. Recuperação	33
2.5.4. Precisão	33
2.5.5. Especificidade	34
2.5.6. Robustez	35
2.5.7. Estabilidade	35
2.5.8. Aplicabilidade	35
2.5.9. Limite de detecção – LD	36
2.5.10. Limite de quantificação – LQ	36
3. Parte experimental	37

3.1.	Materiais	37
3.2.	Reagentes e padrões	37
3.3.	Soluções	38
3.4.	Procedimento experimental	38
3.4.1.	Extracção	38
3.4.2.	Purificação	39
3.4.3.	Identificação por LC-MS/MS	39
3.5.	Procedimento de validação	40
4.	Apresentação e Discussão dos Resultados	44
4.1.	Desenvolvimento da metodologia analítica	44
4.2.	Estudo dos produtos de degradação	52
4.3.	Validação	56
4.3.1.	Selectividade/Especificidade/Aplicabilidade	57
4.3.2.	Robustez	58
4.3.3.	Estabilidade	58
4.3.4.	Veracidade/Recuperação	61
4.3.5.	Precisão	62
4.3.6.	Limite de decisão - $CC\alpha$ e capacidade de detecção - $CC\beta$	63
4.3.7.	Estudo das curvas de calibração	65
4.3.8.	Limite de detecção e limite de quantificação	67
5.	Conclusões	71
6.	Bibliografia	73
7.	Anexos	77
	A – Estudo de estabilidade da amoxicilina	77
	B – Teste de Homogeneidade das variâncias	79
	C – Avaliação da Linearidade	81
	D – Folha de cálculo – critérios de aceitação dos resultados	82

Abreviaturas

6-APA – ácido 6-aminopenicilânico.

ABR – amostra em branco.

ABF – amostra em branco fortificada.

API – do inglês *atmospheric pressure ionization*.

CAD – do inglês *collision gas*.

CC α – limite de decisão.

CC β – capacidade de detecção

CE – do inglês *collision energy*.

CUR – do inglês *curtain gas*.

CV – coeficiente de variação.

Erro α – erro associado à probabilidade de uma amostra analisada ser conforme apesar de se ter obtido um resultado não conforme (decisão falsamente não conforme).

Erro β – erro associado à probabilidade de uma amostra analisada ser não conforme, apesar de se ter obtido um resultado conforme (decisão falsamente conforme).

ESI – ionização por electrospray

HPLC – do inglês *high performance liquid chromatography*.

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial.

LD – limite de detenção do método.

LMR – limite máximo de resíduo.

LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

LQ – limite de quantificação do método.

MRM – do inglês *multiple reaction monitoring*.

PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos.

SIM – do inglês *single ion monitoring*.

TR – tempo de retenção.

TRR – tempo de retenção relativo.

UV – Ultravioleta.

Índice de tabelas

Tabela 1: Classes farmacológicas divididas entre os grupos A e B.	14
Tabela 2: Estruturas de duas penicilinas semi-sintéticas – amoxicilina e ampicilina – e de duas penicilinas naturais – penicilina G e penicilina V.	17
Tabela 3: Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas das transições iónicas para metodologias por LC-MS/MS.	28
Tabela 4: Características de desempenho que devem ser determinadas em métodos quantitativos (o símbolo + significa determinação obrigatória).	30
Tabela 5: Intervalo de veracidade mínima dos métodos quantitativos.	32
Tabela 6: Exemplos de CV de reprodutibilidade para métodos analíticos.	34
Tabela 7: Volume a adicionar de solução de trabalho de ampicilina e amoxicilina por forma a construir a recta de calibração.	38
Tabela 8: Condições de funcionamento do HPLC.	40
Tabela 9: Condições de fragmentação do MS/MS. O ião-produto que se encontra a sublinhado corresponde à transição mais intensa.	40
Tabela 10: Matriz de ensaios efectuados para o estudo de estabilidade variando o pH e a temperatura.	42
Tabela 12: Plano de amostras para o processo de validação.	56
Tabela 13: Dados utilizados no cálculo da recuperação do método.	61
Tabela 14: Resultados obtidos para a determinação da repetibilidade do método.	62
Tabela 15: Resultados obtidos para a determinação da reprodutibilidade do método.	63
Tabela 16: Razões de intensidades (área do pico da amoxicilina/área do pico da ampicilina) para as 20 amostras brancas fortificadas ao nível do LMR, média, desvio padrão e tempo de retenção relativo verificado para cada uma delas.	64
Tabela 17: Intensidades e concentrações de CC α e CC β .	65
Tabela 18: Média e desvio padrão das áreas relativas das 20 amostras brancas.	67
Tabela 19: Concentrações de LD e LQ.	68
Tabela 20: Valores de intensidades relativas obtidos para 10 leituras nas concentrações extremas da curva.	80

Índice de figuras

Figura 1: Cultura contaminada pelo fungo <i>Penicillium</i> .	16
Figura 2: Estrutura molecular do 6-APA.	17
Figura 3: Estrutura geral das penicilinas.	17
R representa a cadeia lateral.	17
Figura 4: Formação do 6-APA a partir dos aminoácidos cisteína e valina.	19
Figura 5: Mecanismo de inibição da transpeptidase pela penicilina.	19
Figura 6: Degradação das penicilinas: 1 – abertura do anel por acção da β -lactamase ou em meio ácido, 2 -hidrólise da amina da cadeia lateral em meio ácido.	20
Figura 7: Reacção de formação da amoxicilina, partindo do 6-APA e do ester metil-hidroxifenilglicina.	22
Figura 8: Concentrações médias da ampicilina e amoxicilina após administração oral de uma dose única de 500mg destes antibióticos ^[15] .	23
Figura 9: Estrutura molecular do ácido clavulânico.	24
Figura 10: Degradação da amoxicilina	24
Figura 11: Estrutura do ácido 5R,6R-amoxicilóico (I) e do ácido 5S,6R-amoxicilóico (II).	25
Figura 12: Representação esquemática do MS/MS do tipo triplo quadrupolo.	29
Figura 13: Representação estatística do limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias com LMR estabelecido.	32
Figura 14: Cromatogramas iónicos, da transição mais intensa da amoxicilina, em duas amostras brancas fortificadas com aquele composto ao nível do LMR: [A] por extracção com coluna OASIS HLB (amoxicilina $t_r=6.83$ min) e [B] por extracção com coluna C18 (amoxicilina $t_r=6.96$ min)	46
Figura 15: Espectro massa da amoxicilina em ESI ⁺ .	47
Figura 16: Espectro de massa da fragmentação do ião protonado da amoxicilina obtido por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos obtidos.	48
Figura 17: Espectro de massa por espectrometria de massa sequencial da ampicilina com ilustração dos fragmentos principais.	49
Figura 18: Estrutura molecular da amoxicilina e principais fragmentos.	50
Figura 19: Cromatogramas das transições iónicas monitorizadas para a amoxicilina e ampicilina. O cromatograma A corresponde à transição mais intensa da amoxicilina (m/z 366>114), B corresponde à 2ª transição da amoxicilina (m/z 366>349). O cromatograma C é referente à transição monitorizada para a ampicilina (m/z 350>106).	51

Figura 20: Espectro de massa do ácido amoxicilóico com identificação dos dois fragmentos mais intensos.	53
Figura 21: Espectro de massa da amoxicilina dicetopiperazina com identificação dos dois fragmentos mais intensos.	54
Figura 22: Cromatogramas de uma das transições controladas para a amoxicilina (m/z 366>349), ácido amoxicilóico (m/z 384>189) e amoxicilina dicetopiperazina (m/z 366>160) numa mistura de padrões a 50 µg/kg.	55
Figura 23: Cromatogramas em que A e B são referentes à transição iónica m/z 366>349 da amoxicilina de uma amostra branca e de uma amostra branca fortificada a 50 µg/kg (tr=6,84), respectivamente. O cromatograma C refere-se ao padrão interno (tr=7,63).	57
Figura 24: Perfil de variação, em áreas, da amoxicilina a pH 1 a várias temperaturas.	59
Figura 25: Perfil de variação, em áreas, da amoxicilina e metabolitos a pH 1 a à temperatura ambiente (22°C).	59
Figura 26: Perfil de variação, a pH 5 e a 55°C, das áreas dos picos da amoxicilina, ácido amoxicilóico e dicetopiperazina ao longo do tempo.	60
Figura 27: Perfil de variação, a pH 10 e a 2-8°C, das áreas dos picos da amoxicilina, ácido amoxicilóico e dicetopiperazina ao longo do tempo.	60
Figura 28: Recta de calibração construída em amostras brancas fortificadas, no dia 1.	66
Figura 29: Recta de calibração construída em amostras brancas fortificadas, no dia 2.	66
Figura 30: Recta de calibração construída em amostras brancas fortificadas, no dia 3.	67
Figura 31: Cromatogramas das transições monitorizadas para a amoxicilina (A corresponde a m/z 366>114 e B a m/z 366>349) e ampicilina (C corresponde a m/z 350>106) ao nível de LD – 5 µg/kg.	69
Figura 32: Cromatogramas das transições monitorizadas para a amoxicilina (A corresponde a m/z 366>114 e B a m/z 366>349) e ampicilina (C corresponde a m/z 350>106) ao nível de LQ – 8 µg/kg.	70

1. Objectivo

A utilização profilática e terapêutica de medicamentos veterinários é essencial na prática moderna de criação intensiva de animais para consumo humano.

Igualmente vulgar é a utilização ilegal de substâncias promotoras de crescimento, onde se incluem as hormonas – tireostáticos e beta-agonistas –, bem como de outros medicamentos de grupos farmacológicos não autorizados^[1].

Estas práticas podem ocasionar o aparecimento de resíduos dos medicamentos administrados nos produtos alimentares obtidos desses animais, em especial quando estes são administrados em doses elevadas pouco tempo antes do abate.

Sendo estes compostos potencialmente tóxicos e, portanto, componentes indesejáveis dos alimentos, a legislação comunitária garante uma elevada protecção dos consumidores. Para tal, determina a avaliação da toxicidade de eventuais resíduos de medicamentos veterinários utilizados em animais para consumo humano, antes da respectiva autorização de introdução no mercado. Quando necessário, são estabelecidos limites máximos de resíduos (LMRs) e, nalguns casos, a utilização da substância é proibida.

O plano de vigilância que assegura o cumprimento das restrições impostas aos produtores é o Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), que é obrigatório em todos os Estados-membros da União Europeia. Este plano abrange os animais vivos (pelo controlo analítico de fluidos biológicos, ração e água de bebida colhidas nas explorações) e os provenientes de matadouros (pela análise dos tecidos edíveis). Abrange, igualmente, outros produtos, tais como leite, ovos e mel.

A amoxicilina é um composto farmacologicamente activo com propriedades antimicrobianas, muito utilizado em medicina veterinária e, especialmente, em produção intensiva de animais para consumo humano. O seu uso pelos produtores é permitido, embora com algumas restrições, a principal das quais se resume à necessidade de se respeitar um intervalo de segurança (tempo que decorre entre a última administração e o abate do animal), por forma a que os tecidos edíveis, ao conterem resíduos de amoxicilina, não ultrapassem o respectivo LMR.

Desta forma, para o controlo dos compostos com LMR não só é necessária a sua pesquisa como a determinação quantitativa, quando presente, no intuito de avaliar a conformidade das amostras, de acordo com o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido ^[2,3].

É o caso da amoxicilina.

Assim, o objectivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento analítico suficientemente simples, mas robusto e eficaz, tendo em conta os critérios analíticos definidos pela Decisão da Comissão Europeia 2002/657/CE ^[4] para os compostos com LMR, para a pesquisa, identificação e quantificação de amoxicilina em tecidos edíveis de origem animal, no intuito de ser utilizado na rotina laboratorial destinada ao controlo de amostras oficiais colhidas, para verificação da utilização indevida daquele composto por parte dos produtores.

2. Introdução

2.1. *Medicamentos veterinários e protecção dos consumidores*

Todos os anos, no Mundo, milhões de pessoas sofrem de doenças provocadas pelos alimentos que consomem.

A encefalopatia espongiforme bovina (EEB) – vulgarmente conhecida como a doença das vacas loucas, cujas repercussões na saúde pública são ainda desconhecidas nas suas totalidade e extensão –, a crise das dioxinas – com origem na Bélgica, em resultado da entrada na cadeia alimentar de grandes quantidades de dioxinas por via da contaminação de matérias-primas utilizadas em alimentação animal, tendo resultando no abate de enormes quantidades de aves e suínos – ou, ainda, o escândalo da detecção de cloranfenicol em gado bovino – em resultado da incorporação de produtos de aquacultura, importados da China, Vietname e Indonésia, contaminados com aquele composto, nas rações para estes animais, produtos esses que passaram incólumes pela fronteira alemã para o espaço europeu – constituíram factos de forte impacto mediático que motivaram irremediáveis quebras de confiança dos consumidores europeus.

No entanto, a utilização profilática e terapêutica de medicamentos veterinários é essencial na prática moderna de criação intensiva de animais para consumo humano, sendo, igualmente, uma componente muito importante do bem-estar animal.

Sendo estes compostos potencialmente tóxicos para os consumidores, a legislação comunitária impõe regras muito estritas na utilização de medicamentos veterinários pelos produtores de animais destinados ao consumo humano^[1,2,3,4]. De acordo com esta legislação, os medicamentos veterinários são divididos em dois grandes grupos:

- Grupo A – o das substâncias proibidas, que demonstram efeito anabolizante, e não autorizadas;
- Grupo B – o das substâncias autorizadas sujeitas a determinadas restrições. A este grupo foram também adicionadas as substâncias denominadas de contaminantes ambientais.

Nos quadros seguintes encontramos as diferentes classes farmacológicas integradas em cada um dos grandes grupos acima referenciados.

Tabela 1: Classes farmacológicas divididas entre os grupos A e B. Na tabela, NA refere-se a compostos não autorizados e P a compostos proibidos (razões históricas estão na origem destes dois termos).

Grupo A: substâncias com ação anabolizante e substâncias não autorizadas	
Estilbenos e derivados	P
Tireostáticos	P
Hormonas anabolizantes	P
Lactonas do ácido resorcilico	P
Beta-agonistas	P
Cloranfenicol	NA
Clorpromazina	NA
Nitrofuranos	NA
Nitroimidazois	NA
Grupo 1B: Medicamentos sujeitos a restrições	
Sulfonamidas Penicilinas (β -lactâmicos) Tetraciclinas Quinolonas Aminoglicosidos Quinoxalinas	LMR
Antihelmínticos	LMR
Coccidiostáticos	LMR/NA
Sedativos	LMR
Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)	LMR
Corticosteróides	LMR
Grupo 2B: Contaminantes ambientais	
Compostos organofosforados	LMR
Compostos organoclorados	LMR
PCBs e dioxinas	LMR
Elementos químicos	LMR
Micotoxinas	LMR
Corantes	LMR

Em termos práticos, todos os produtos de origem animal deverão estar isentos de resíduos de compostos proibidos ou não autorizados ou conter uma concentração abaixo do respectivo limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido (espécie animal/matriz) para os autorizados sujeitos a restrições. Caso contrário, estes produtos são considerados impróprios para consumo e deverão ser destruídos. Para os princípios activos dos medicamentos sujeitos a

LMR, os produtores, após a administração dos mesmos, têm de respeitar os denominados intervalos de segurança que se encontram estabelecidos por cada composto/espécie animal.

O plano de vigilância que assegura o cumprimento da legislação sobre resíduos é o Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), o qual é obrigatório em todos os Estados-membros da União Europeia. O referido plano abrange os animais vivos (pelo controlo analítico de fluidos biológicos, ração e água de bebida colhidas nas explorações) e os recolhidos nos matadouros (pela análise dos tecidos edíveis). Abrange, igualmente, outros produtos, tais como leite, ovos e mel.

No caso do grupo dos antimicrobianos, uma vez que são compostos sujeitos a LMR, o controlo analítico terá de utilizar metodologias analíticas, não só capazes de identificar o composto, mas também de o quantificar.

2.2. Medicamentos antimicrobianos – as penicilinas

2.2.1. Alguns dados históricos

Alexander Fleming, bacteriologista em Londres, impelido pelas preocupações adjacentes às mortes causadas por infecções durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), desenvolvia pesquisas no intuito de descobrir substâncias capazes de matar ou impedir o crescimento de bactérias^[6]. Em 1928, enquanto estudava variantes de estafilococos, observou que uma das culturas havia sido contaminada por um bolor e que este provocara o desaparecimento das bactérias na sua vizinhança (figura 1). Fleming e o seu colega, Dr. Pryce, identificaram um fungo do género *Penicillium* e demonstraram que este produzia uma substância responsável pelo efeito bactericida – a penicilina. Verificando o efeito desta substância em diferentes culturas, foi possível constatar quais as espécies de bactérias sensíveis à acção das penicilinas, que se provou serem apenas organismos aeróbios, gram-positivas não produtoras de β -lactamases^[12,13].

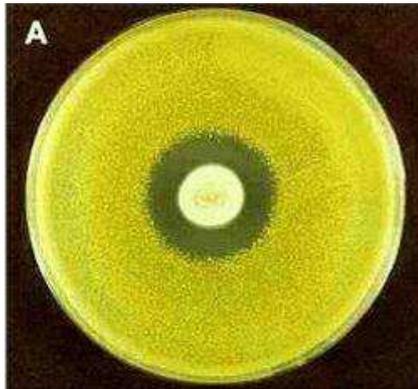


Figura 1: Cultura contaminada pelo fungo *Penicillium*.

O isolamento e a purificação da penicilina foram efectuados apenas em 1940, por Howard Florey e Ernst Chain, na Universidade de Oxford^[12,13,14]. Depois de estudar as suas qualidades antibacterianas e a sua atoxicidade, foram realizados testes em humanos, cujos resultados comprovaram a sua eficácia. Em 1944 estava já desenvolvido um processo de fermentação, o qual disponibilizava uma produção em larga escala de penicilina.

A penicilina salvou a vida a milhares de soldados aliados na Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Durante muito tempo, o capítulo que a penicilina abriu na história da Medicina parecia prometer o fim das doenças infecciosas de origem bacteriana como causa de mortalidade humana, motivo porque, em 1945, Fleming, Florey e Chain receberam o Prémio Nobel da Medicina.

Em 1950, a família de antibióticos β -lactâmicos consistia em dois compostos com espectro de acção limitado: penicilina G e penicilina V. Apesar do impacto revolucionário que tiveram, as penicilinas naturais nunca foram completamente eficazes contra todo o tipo de bactérias e o desenvolvimento de estirpes de bactérias resistentes era um problema a combater. O desenvolvimento de novas penicilinas, com espectro de acção mais alargado, foi conseguido pela modificação da cadeia lateral da molécula. As primeiras experiências foram efectuadas através de reacções de fermentação, não se conseguindo, no entanto, grande diversidade de compostos. Mais tarde, por síntese e isolamento da p-aminobenzilpenicilina, foi possível obter uma outra molécula – ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) – que, não possuindo nenhuma cadeia lateral, esteve na origem da produção dos beta-lactâmicos semi-sintéticos em 1960^[14]. A descoberta deste composto foi o ponto de partida para o crescimento da família das penicilinas.

O objectivo de se conseguir uma penicilina de largo espectro foi conseguido em 1961, pela síntese da ampicilina, e em 1971, pela da amoxicilina^[15, 16]. Estas duas penicilinas, designadas

de aminopenicilinas ou penicilinas semi-sintéticas, são muito semelhantes em termos estruturais e em espectro de acção, no entanto, a amoxicilina tem melhor absorção quando administrada via oral, atingindo concentrações duas vezes mais elevadas no sangue do que a ampicilina.

Embora mais tarde tivessem sido obtidas penicilinas de espectro verdadeiramente mais amplo, as aminopenicilinas constituíram o primeiro passo no sentido da obtenção de penicilinas de maior resistência que abrangessem no seu espectro bactérias gram-negativas.

2.2.2. Química das penicilinas

Actualmente, estão identificadas mais de 40 penicilinas, algumas naturais, outras semi-sintéticas. A composição de todas as penicilinas apresenta um núcleo comum: o 6-APA (figura 2), que é o responsável pela actividade destes compostos. Este núcleo é composto por um anel tiazolidínico e por um anel β -lactâmico, ao qual está ligado um grupo amina que inicia a cadeia lateral nas penicilinas (figura 3). A presença do grupo carboxilo confere a todas as penicilinas natureza ácida. No entanto, as aminopenicilinas possuem, também, um grupo básico – o grupo amina, o que as torna moléculas anfotéricas.

A obtenção de uma dada penicilina está relacionada com a cadeia lateral R obtida durante o processo de fermentação. O radical R dá o nome à penicilina, de acordo com a seguinte tabela, onde estão evidenciados alguns exemplos, nomeadamente: duas penicilinas naturais (penicilina G e penicilina V) e duas semi-sintéticas (amoxicilina e ampicilina).

Figura 2: Estrutura molecular do 6-APA.

1. Anel β -lactâmico
2. Anel tiazolidínico

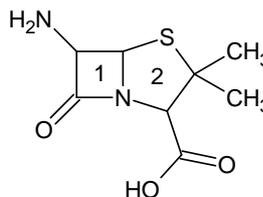


Figura 3: Estrutura geral das penicilinas.
R representa a cadeia lateral.

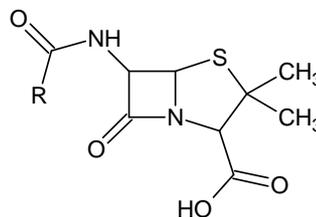
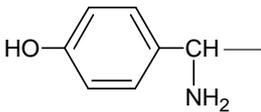
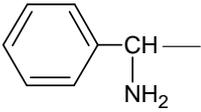
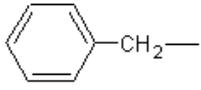
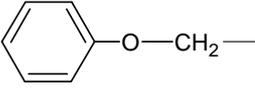


Tabela 2: Estruturas de duas penicilinas semi-amoxicilina e ampicilina – e de duas penicilinas naturais

sintéticas –
– penicilina G e

penicilina V.

Radical R	Designação da penicilina
	Amoxicilina
	Ampicilina
	Penicilina G
	Penicilina V

A cadeia lateral determina muitas das características antibacterianas e farmacológicas de cada uma das penicilinas. Em relação às penicilinas naturais, a cadeia lateral depende da composição química do meio de fermentação utilizado na sua obtenção.

A presença do anel β -lactâmico é a responsável pela designação geral destes antibióticos de β -lactâmicos e provém da ligação de dois aminoácidos: cisteína e valina (figura 4). Quando estas duas estruturas se juntam, forma-se o núcleo bicíclico 6-APA ^[56].

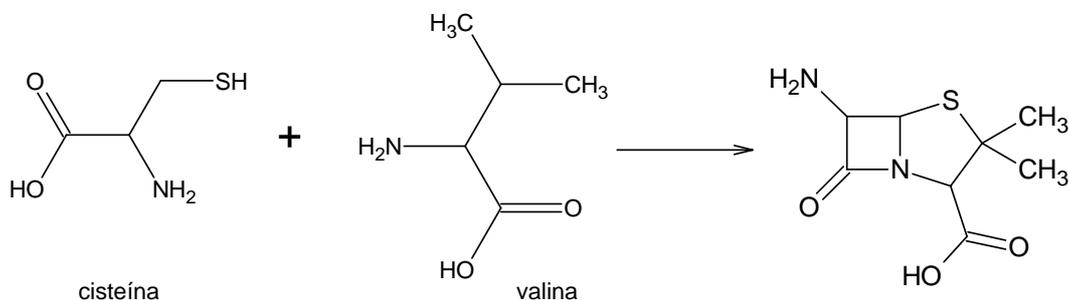


Figura 4: Formação do 6-APA a partir dos aminoácidos cisteína e valina.

Este sistema cíclico de quatro membros é altamente reactivo. A ligação amida está sujeita a uma forte tensão, o que a torna muito susceptível a ataques por reagentes nucleófilos, o que resulta na abertura do anel^[10,59].

As penicilinas interferem na síntese das paredes celulares das bactérias, por reacção com o grupo amina presente na enzima transpeptidase, responsável pela etapa final da biossíntese do peptidoglicano da parede bacteriana. Esta reacção envolve a ruptura do anel β-lactâmico e a acilação da enzima (figura 5). Deste modo as enzimas deixam de estar disponíveis como catalisadoras na formação das ligações cruzadas transpeptidásicas que conferem rigidez à estrutura celular^[59].

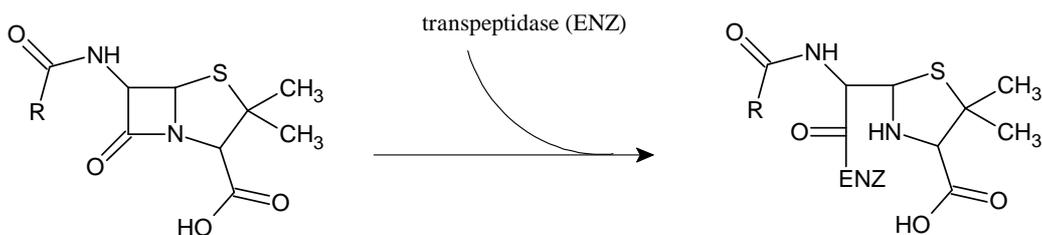


Figura 5: Mecanismo de inibição da transpeptidase pela penicilina.

A penicilina ocupa, na transpeptidase, o lugar do substrato D-alanil-D-alanina, uma vez que existe uma grande analogia estrutural entre a molécula de antibiótico e o substrato em questão.

Depois de se formar o complexo penicilina-enzima, a etapa final da síntese da parede celular não ocorre e a bactéria morre^[5,17,28].

Para que a actividade destes antibióticos seja efectiva é, então, necessário que o seu núcleo central se mantenha intacto. A transformação metabólica ou a ocorrência de qualquer alteração química nessa porção da molécula resulta na perda de toda a actividade antibacteriana. Algumas penicilinas hidrolizam-se muito facilmente na presença de metais pesados, ácidos e bases e são desactivadas na presença das enzimas β -lactamases, presentes como substâncias naturais em muitos microrganismos. A acidez gástrica pode hidrolisar a amida da cadeia lateral e, tal como no caso da presença de β -lactamases, provocar a abertura do anel de quatro membros (figura 6).

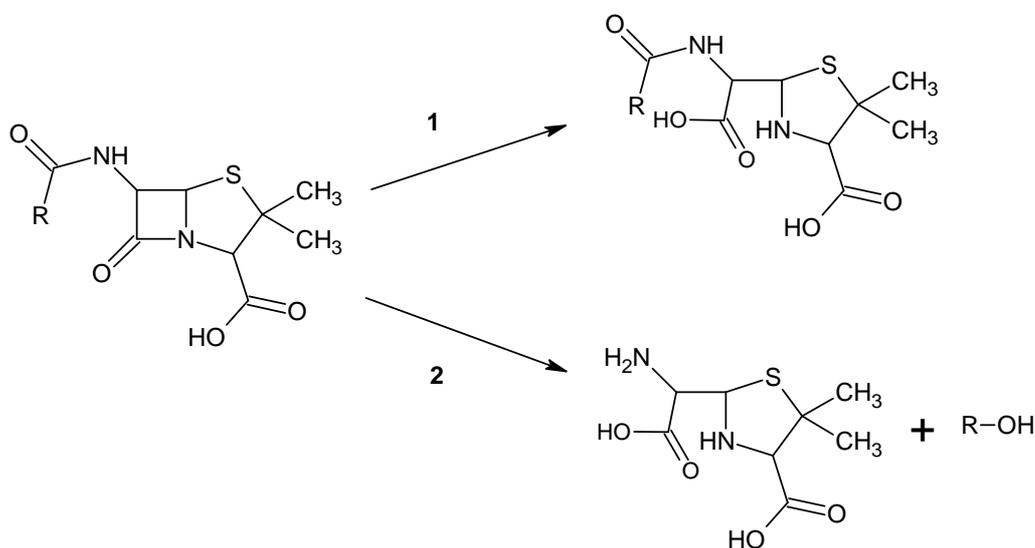


Figura 6: Degradação das penicilinas: **1** – abertura do anel por acção da β -lactamase ou em meio ácido, **2** -hidrólise da amina da cadeia lateral em meio ácido.

No caso da penicilina G (benzilpenicilina), esta é hidrolisada muito facilmente em meio ácido, formando o respectivo ácido penicilóico, que não tem qualquer actividade terapêutica. Este facto torna inadequada a utilização da penicilina G por via oral. A mesma degradação acontece na presença da generalidade das β -lactamases. Deste modo, o seu espectro de acção é pouco amplo e, tendo em conta a crescente emergência de estirpes produtoras de β -lactamases, a tendência é para se utilizar cada vez menos esta penicilina natural.

A penicilina V (fenoximetilpenicilina) é mais resistente em meio ácido e, como tal, pode ser administrada via oral. Por outro lado, tem uma actividade cerca de cinco a dez vezes menos eficaz sobre as bactérias gram-negativas que a bezilpenicilina, não podendo ser considerada uma boa substituta desta.

As penicilinas semi-sintéticas são antibióticos de largo espectro, resistentes a pH baixo, que podem ser administrados por via oral. Este grupo de penicilinas, para além de ser eficaz contra bactérias gram-positivas, também é activo contra algumas gram-negativas^[5]. Contudo, continuam a ser compostos susceptíveis de perder actividade por acção de enzimas β -lactamases o que implica a utilização de inibidores destas enzimas a acompanhar a administração das aminopenicilinas. Existe uma correlação inversa entre a sensibilidade de um antibiótico β -lactâmico à inactivação por β -lactamases e a capacidade de inactivar microrganismos. Neste caso, as penicilinas semi-sintéticas, que são facilmente hidrolisadas por estas enzimas, são activas contra as bactérias gram-negativas produtoras de β -lactamases.

Na produção das penicilinas semi-sintéticas, o núcleo activo 6-APA é acilado por condensação com vários compostos, de acordo com a penicilina semi-sintética que se pretende obter. Para tal, a 6-APA é primeiramente isolado da penicilina G, por hidrólise sob acção da enzima penicilina G acilase e da Penicilina V pela penicilina V acilase. Estas enzimas clivam a ligação peptídica através da qual a cadeia lateral da penicilina está ligada ao 6-APA.

A amoxicilina e a ampilicina são então obtidas pela condensação do 6-APA com a amina ou éster 4-hidroxifenilglicina e fenilglicina correspondentemente^[15,16,53]. Esta reacção está evidenciada na figura 7.

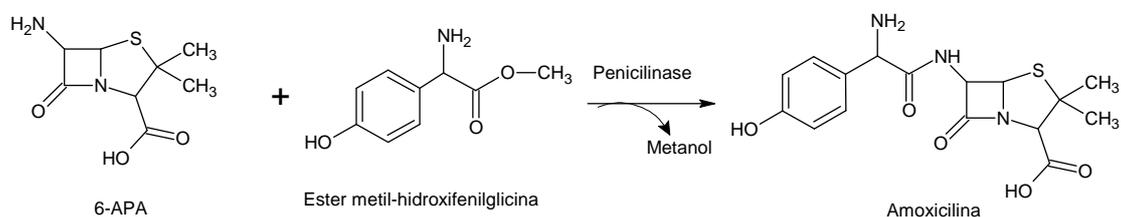


Figura 7: Reacção de formação da amoxicilina, partindo do 6-APA e do ester metil-hidroxifenilglicina.

Após a administração, todas as penicilinas se distribuem pelos fluidos intersticiais, através da corrente sanguínea. A entrada das moléculas de penicilina nas células é mais eficaz quando existe inflamação, uma vez que, nestes casos, a permeabilidade das membranas das células aumenta.

As penicilinas são facilmente eliminadas por via urinária, de modo que o tempo de vida destes fármacos no corpo é curto – cerca de 30 a 90 minutos. Deste modo, após a administração, são de esperar concentrações elevadas na urina^[17,28].

2.2.3. Amoxicilina

Estudos posteriores ao desenvolvimento da ampicilina demonstraram que a introdução de um grupo p-hidroxilo na sua cadeia lateral aumentava a absorção do composto por via gastrointestinal. Desta modificação surgiu a amoxicilina.

Embora a ampicilina tenha sido a primeira aminopenicilina a ser introduzida em terapêutica, a amoxicilina é considerada o composto-padrão deste grupo, dado que, embora apresentando um espectro idêntico, tem maior biodisponibilidade via oral, sendo que entre 74 e 92 % da dose administrada é absorvida. Na figura 8 está representada a evolução da concentração plasmática ao longo do tempo após administração oral de uma dose única de 500 mg de ampicilina e amoxicilina^[17] em humanos.

O pico de concentração máxima de amoxicilina é atingido ao fim de cerca de duas horas e, apesar de ter uma boa absorção, grande parte do fármaco é excretado na sua forma activa

pela urina. O tempo de semi-vida deste composto é de cerca de 0,7 a 1,4 h e, num período de 6 a 8 h após a administração, recupera-se na urina, sob forma intacta, até 80 por cento da dose absorvida. Por via injectável, a amoxicilina atinge, igualmente, concentrações elevadas no organismo, as quais, contudo, decrescem rapidamente, quer se trate de via intramuscular ou via intravenosa. A amoxicilina distribui-se facilmente pelos tecidos e líquidos orgânicos e apenas 19 a 33 % da fracção absorvida é metabolizada, essencialmente pela hidrólise do anel β -lactâmico com formação do ácido amoxicilóico, que é o correspondente ácido penicilóico nas restantes penicilinas. A responsabilidade pela maioria das reacções alérgicas às penicilinas deve-se à formação destes compostos. Apesar do potencial risco para a saúde humana, o ácido amoxicilóico não está incluído no LMR da amoxicilina.

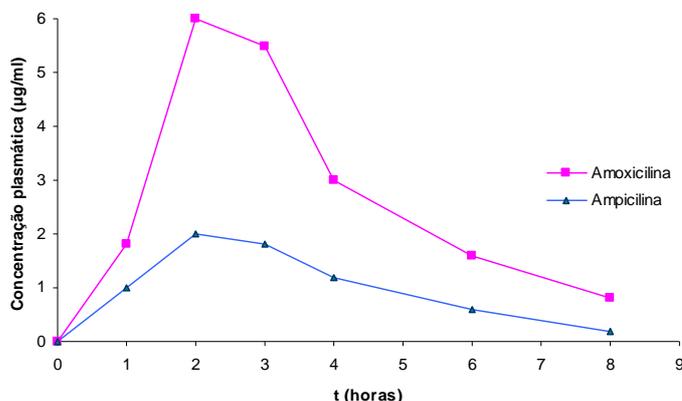


Figura 8: Concentrações médias da ampilicina e amoxicilina após administração oral de uma dose única de 500mg destes antibióticos ^[15].

A amoxicilina é activa sobre a generalidade das bactérias gram-positivas e sobre algumas gram-negativas. As segundas diferem das primeiras porque possuem uma camada externa de lipopolissacarídeos por cima da camada de peptidoglicanos^[5]. As aminopenicilinas têm maior facilidade de atravessar essa membrana lipopolissacarídea, por serem mais hidrofílicas, permitindo, assim, que se atinjam concentrações terapêuticas eficazes nos locais de acção. A menos que seja acompanhada de um inibidor de β -lactamases, a sua acção torna-se ineficaz caso a bactéria em causa seja produtora dessas enzimas. Os inibidores utilizados têm a capacidade de se ligarem eles próprios às β -lactamases, deixando a amoxicilina livre para a

sua actuação, melhorando a sua eficiência. Um exemplo de um inibidor bastante utilizado é o do ácido clavulânico^[18,19], que apresenta uma estrutura molecular bastante semelhante à das penicilinas (figura 9).

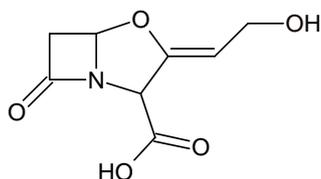


Figura 9: Estrutura molecular do ácido clavulânico.

É possível que a degradação da amoxicilina em ácido amoxicilóico conduza, por sua vez, a outros compostos: o ácido amoxilóico (o correspondente na amoxicilina ao ácido penilóico) e à amoxicilina dicetopiperazina^[20,21,22,23,24,25]. A figura 10 apresenta os principais metabolitos da amoxicilina.

O ácido amoxicilóico pode apresentar dois compostos isómeros dia-esteriómeros^[21], conforme está representado na figura 11: o ácido 5R,6R-amoxicilóico e o ácido 5S,6R-amoxicilóico.

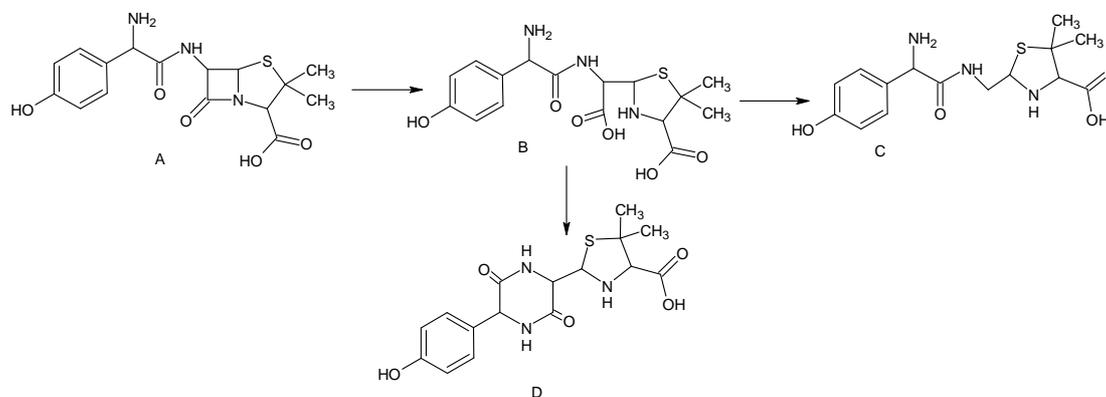


Figura 10: Degradação da amoxicilina

- A – Amoxicilina;
- B – Ácido amoxicilóico;
- C – Ácido amoxilóico;
- D – Amoxicilina dicetopiperazina.

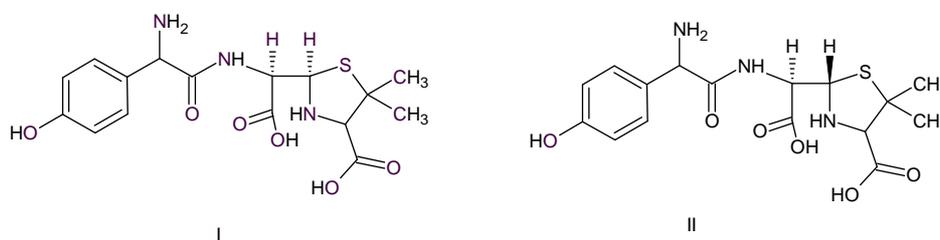


Figura 11: Estrutura do ácido 5R,6R-amoxicilóico (I) e do ácido 5S,6R-amoxicilóico (II).

2.3. *Aplicação em medicina veterinária*

As penicilinas são um grupo de antibióticos utilizados quer em medicina humana quer em medicina veterinária. No caso concreto da aplicação da amoxicilina em veterinária, esta é clinicamente efectiva no tratamento de infecções cutâneas, do tracto respiratório, urinário e gastrointestinal^[21,28,45]. Tal como acontece com as restantes penicilinas, não são conhecidos efeitos tóxicos recorrentes da sua administração. As principais contra-indicações ocorrem em indivíduos sensíveis a estes compostos, cujas reacções de hipersensibilidade podem culminar em choques anafiláticos^[5,6,7,8,28,45].

Por outro lado, o possível desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes ao antibiótico, recorrente do consumo continuado de alimentos contendo resíduos do mesmo, é também um efeito negativo a considerar^[9,21,28,33,45]. Este fenómeno verifica-se quando não são respeitados os intervalos de segurança desde a administração do medicamento até ao abate do animal.

Quando estes antibióticos são usados de forma continuada e em concentrações abaixo das terapêuticas na produção animal, como promotores de crescimento, é possível que os alimentos daí gerados para consumo humano venham contaminados com bactérias resistentes. Tal situação pode levar a que o consumidor seja exposto a estas estirpes resistentes e, deste modo, se torne insensível à utilização destes fármacos em futuras infecções^[9,10,11].

Para salvaguardar a saúde dos consumidores, a União Europeia estabeleceu LMR para as penicilinas, que dependem do composto em causa e da matriz. Para a amoxicilina, uma das penicilinas mais utilizadas a nível mundial, o LMR em tecidos edíveis é de 50 µg/kg para qualquer espécie animal de consumo humano^[1].

2.4. Determinação analítica da amoxicilina

Os procedimentos analíticos a utilizar no controlo oficial da pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em amostras biológicas, colhidas de animais destinados ao consumo humano, devem cumprir os critérios de desempenho definidos na Decisão da Comissão 2002/657/CE^[4].

No caso da amoxicilina, e uma vez que a utilização deste composto é permitida, estando apenas sujeita a intervalo de segurança por ter LMR estabelecido^[1], a metodologia analítica deverá ser capaz de pesquisar a presença do composto na matriz em análise e, quando presente, identificá-la inequivocamente e proceder à sua quantificação.

Tradicionalmente, os resíduos de antibióticos em tecidos animais são detectados por ensaios microbiológicos de multideteção^[29,30]. Este tipo de metodologia, apesar de sensível, é pouco específico. A distinção da amoxicilina de entre os restantes β-lactâmicos não é possível. Os ensaios microbiológicos devem apenas ser aplicáveis quando se pretende fazer triagem à presença do grupo de compostos. A confirmação e quantificação da presença da amoxicilina deve ser efectuada utilizando métodos mais específicos, mais concretamente, métodos de cromatografia, sendo estes os únicos capazes de respeitar os critérios de identificação exigidos.

O HPLC com detecção por fluorescência^[29,32] demonstrou ser uma metodologia bastante específica mas, por envolver derivatização dos compostos, é igualmente complexa e demorada. A utilização de detecção por UV^[24,30,59] torna o método mais simples e rápido, mas este perde a sensibilidade necessária à determinação da amoxicilina presente em níveis baixos^[29,30].

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa é actualmente considerada uma metodologia analítica de referência para a detecção e a confirmação inequívoca da presença de resíduos de compostos medicamentosos de uso veterinário, como é o caso da

amoxicilina^[20,21,22,29,33,38,39,45,46,51,52]. Quando se pretende fazer a determinação simultânea deste composto com os seus produtos de degradação unicamente utilizando este tipo de metodologia é possível fazê-lo.

As vantagens demonstradas por este tipo de método prendem-se com a elevada especificidade o que possibilita o desenvolvimento de um método que apresente um baixo número de falsos positivos e/ou negativos.

2.4.1.Extracção das amostras

Em geral, os procedimentos extractivos de resíduos em amostras biológicas envolvem a extracção dos analitos da matriz biológica para um solvente apropriado e, seguidamente, por purificação sólido/líquido, mais comumente designada extracção em fase sólida.

Este tipo de extracção é muito utilizada, pela sua eficácia na purificação de extractos e concentração dos analitos de interesse. Conhecendo as características dos compostos em questão, relativamente às suas polaridade e solubilidade e se é extraído em meio ácido ou básico, é possível determinar quais as colunas de extracção indicadas.

No caso da amoxicilina, sendo um composto hidrofílico e polar, a utilização de colunas OASIS HLB, ou seja, *hidrofilic-lipofilic balance*, compostas mais concretamente por igual parte de dois monómeros, um hidrofílico (vinilpirrolidina) e um lipofílico (divinilbenzeno), demonstra ser a opção mais indicada. A parte hidrófila do polímero contribui com um aumento da polaridade da fase sólida, enquanto que a lipofílica aumenta a área da superfície de retenção^[67,68].

2.4.2.Métodos de detecção

Para uma identificação inequívoca que permita igualmente quantificar o composto deve ser monitorizado mais do que um ião. A utilização de LC-MS/MS possibilita o controlo do ião molecular e de transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo. Os princípios de monitorização de um ião (SIM) ou de monitorização de reacções múltiplas (MRM) garantem a sensibilidade e a especificidade necessárias para a quantificação de analitos, em concentrações, por vezes vestigiais, presentes em matrizes de elevada complexidade.

Quando a metodologia utilizada se baseia em detecção por espectrometria de massa, os resultados a interpretar são cromatogramas iônicos e as grandezas analíticas medidas em relação ao analito e respectivo padrão interno são: o tempo de retenção, a intensidade dos picos e a amplitude do ruído. Para se considerar que está presente um sinal cromatográfico, é necessário que exista uma relação sinal/ruído (em amplitude) superior a três. Existem ainda outros critérios de identificação, estabelecidos na legislação, que as metodologias por LC-MS/MS devem cumprir. Os restantes critérios prendem-se com a variação permitida nos tempos de retenção relativos e nas razões iónicas (tolerâncias apresentadas na tabela 3). A razão entre os tempos de retenção cromatográficos da substância a analisar e do padrão interno, isto é, o tempo de retenção relativo, deve corresponder ao da solução de calibração com uma tolerância de 2,5 por cento.

Intensidade relativa	Tolerância relativa
> 50%	± 20%
20 a 50%	± 25%
10 a 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Tabela 3: Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas das transições iónicas para metodologias por LC-MS/MS.

Contudo, existe um fenómeno em LC-MS/MS, conhecido por supressão iónica^[41,42], que tem de ser tido em conta quando se analisam compostos em matrizes complexas, como é o caso do músculo. A supressão iónica deve-se, aparentemente, à presença de compostos interferentes, provenientes da matriz e/ou do processo extractivo. Compostos menos voláteis podem alterar a eficiência da evaporação do solvente, o que altera a quantidade de iões em fase gasosa que entram no detector. Este fenómeno pode comprometer a capacidade de detecção do analito e a repetibilidade dos resultados. A sua prevenção passa pela apropriada preparação da amostra e pelas purificação e limpeza do extracto. Por vezes, a simplificação da metodologia extractiva

pode ser responsável pela existência de maior quantidade de compostos interferentes responsáveis por este fenómeno.

Neste trabalho foi utilizada um LC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo. Na figura 12 está representado esquematicamente o percurso dos iões em LC-MS/MS do tipo triplo quadrupolo. Após ionização, o Q0 dirige os iões, com colisão focalizada para o 1.º quadrupolo, Q1, que constitui o primeiro filtro de massas. Em Q2, 2.º quadrupolo, encontra-se a célula de colisão onde as moléculas são fragmentadas, passando para o segundo filtro de massas, o 3.º quadrupolo, Q3^[31,37].

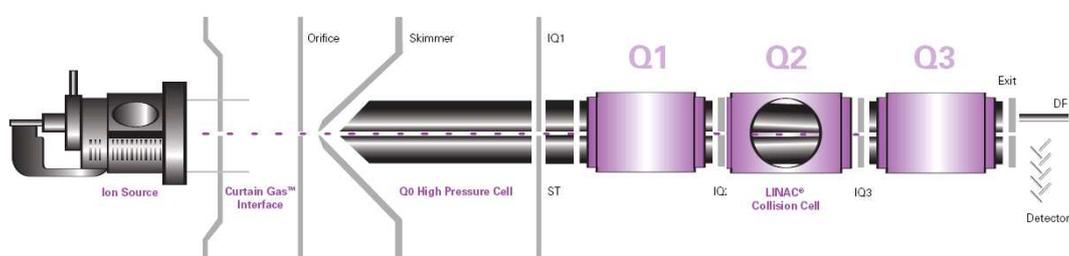


Figura 12: Representação esquemática do MS/MS do tipo triplo quadrupolo.

2.5. Validação

Os critérios que definem a *performance* esperada nos métodos de triagem e confirmação utilizados no controlo oficial das drogas veterinárias estão estabelecidos na Decisão da Comissão 2002/657/EC^[2]. De acordo com os critérios estabelecidos pela União Europeia, as metodologias desenvolvidas e em uso devem ser validadas conforme parâmetros definidos, dependendo tratar-se de métodos quantitativos ou qualitativos e estes serem de triagem ou de confirmação^[20,21,36]. A tabela 4 refere-se apenas a métodos quantitativos.

Tabela 4: Características de desempenho que devem ser determinadas em métodos quantitativos (o símbolo + significa determinação obrigatória).

	Capacidade de detecção CC β	Limite de decisão CC α	Veracidade/ recuperação	Precisão	Selectividade/ especificidade	Aplicabilidade/ robustez/ estabilidade
Triagem	+			+	+	+
Confirmação	+	+	+	+	+	+

Em métodos cujos compostos tenham LMR, a validação é feita em torno desse valor e não nos limites reais de detecção e quantificação do método. Neste caso, é importante avaliar o limite a partir do qual é proibida a presença do composto em causa. No entanto, de forma a conhecer melhor quais os limites reais do método, pode-se, para além das características atrás referidas, recorrer ao cálculo dos limites de detecção e quantificação associados ao analito em questão^[33].

2.5.1. Limite de decisão – CC α – e capacidade de detecção - CC β

O limite de decisão – CC α – é aquele a partir do qual uma amostra pode ser declarada não conforme (amostra que contém o analito no caso de se tratar de uma substância interdita ou que o contém em concentrações superiores ao LMR estabelecido) com uma probabilidade de erro igual a α (erro de um por cento para substâncias não permitidas e de cinco por cento para substâncias com LMR).

A capacidade de detecção – CC β – de um método é o limite a partir do qual o analito pode ser detectado, identificado e/ou quantificado com uma probabilidade de erro β (erro de cinco por cento para todas as substâncias permitidas ou não). No caso das substâncias com LMR, é a concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com certeza estatística de $1-\beta$.

Na validação de um método de triagem, a avaliação destes parâmetros é feita com base na transição mais intensa do analito; porém, no caso dos métodos de confirmação, o cálculo

baseia-se na segunda transição, ou seja, no sinal mais crítico, uma vez que nesta situação é fundamental uma identificação inequívoca da presença do composto.

Para compostos com LMR, o $CC\alpha$ é a concentração correspondente à intensidade $I_{cc\alpha}$.

$$I_{cc\alpha} = \mu_{LMR} + 1.64\sigma_{LMR} \quad (\text{equação 1})$$

Na equação 1 μ_{LMR} e σ_{LMR} são, respectivamente, a média e o desvio-padrão de amplitude de sinal do analito ao nível de LMR. O cálculo destes parâmetros é feito a partir de 20 amostras brancas fortificadas ao nível do LMR.

A transformação do sinal $I_{cc\alpha}$ em concentração é conseguida utilizando uma curva de calibração construída em amostras brancas fortificadas. A curva deverá ter seis níveis de fortificação, incluindo o ponto zero; entre esses níveis deverão constar: $\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR.

O valor de concentração $CC\beta$ corresponde à intensidade de sinal $I_{cc\beta}$, que é a soma de 1,64 vezes o desvio σ_{LMR} a $I_{cc\alpha}$.

$$I_{cc\beta} = I_{cc\alpha} + 1.64\sigma_{LMR} \quad (\text{equação 2})$$

Mais uma vez, com base na curva de calibração é feita a correspondência da intensidade $I_{cc\beta}$ à concentração $CC\beta$. A figura 13 é uma representação estatística da dispersão dos sinais para analitos com LMR. A amplitude máxima do sinal ao nível do LMR dá-nos a concentração $CC\alpha$ com um erro associado de cinco por cento, erro esse que representa o número de possíveis falsos positivos. A amplitude mínima do sinal de $CC\beta$ corresponde ao erro – de cinco por cento – associado aos falsos negativos.

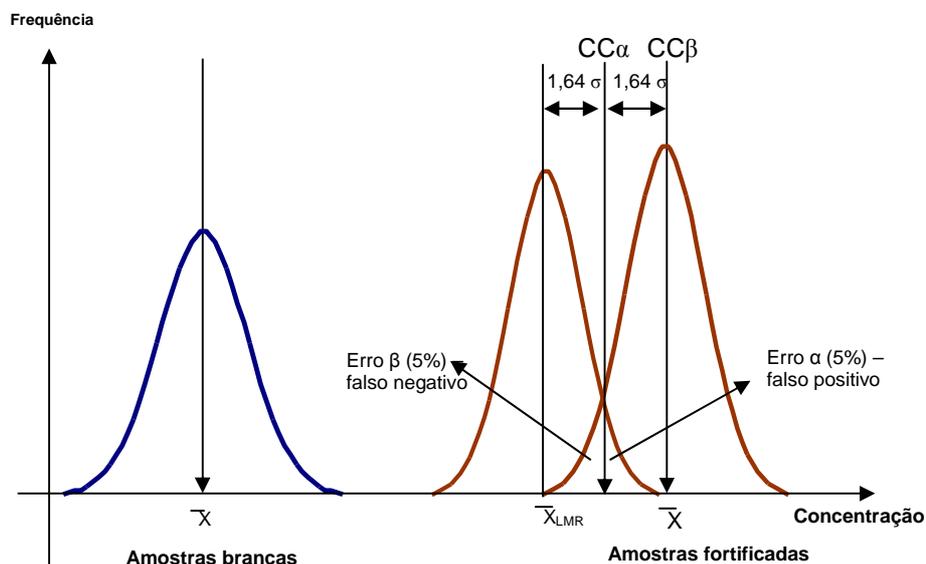


Figura 13: Representação estatística do limite de decisão e capacidade de detecção para substâncias com LMR estabelecido.

2.5.2. Veracidade

A veracidade é uma dos componentes da exactidão e deve ser calculada utilizando materiais de referência certificados. Este parâmetro mede a diferença entre a concentração estimada de um analito numa amostra analisada e a concentração real do analito na mesma. Está estabelecido na legislação, conforme a tabela 5, qual a veracidade mínima aplicável em métodos de análise quantitativa.

Tabela 5: Intervalo de veracidade mínima dos métodos quantitativos.

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

Nos casos em que não está disponível material de referência procede-se ao cálculo da recuperação.

2.5.3. Recuperação

A recuperação mede o rendimento da extracção, ou seja, a fracção de massa do analito contido na amostra que se encontra presente no extracto final. Este parâmetro deve ser determinado para os três níveis de fortificação (1/2 LMR, LMR e 1,5 LMR) em, pelo menos, seis ensaios paralelos.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{teor medido}}{\text{nível de fortificação}} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

2.5.4. Precisão

A precisão engloba a variabilidade dos resultados em duas situações: utilização do método em condições idênticas (repetibilidade) ou com modificações de, pelo menos, um parâmetro (reprodutibilidade intra-laboratorial).

Para o cálculo da repetibilidade devem-se efectuar várias análises em paralelo (pelo menos seis réplicas) para cada um dos níveis de fortificação: 1/2 LMR, LMR e 1,5 LMR.

No caso da reprodutibilidade, executam-se as mesmas análises, mas em dias diferentes, num mínimo de três dias, variando o operador e a matriz.

Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade são traduzidas em termos de coeficiente de variação.

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \quad (\text{equação 4})$$

Em que σ é o desvio-padrão e μ a média dos resultados.

A reprodutibilidade de um método não deve exceder o nível calculado através da equação de Horwitz:

$$CV = 2^{(1-0.5\log C)} \quad (\text{equação 5})$$

A concentração C é expressa sob a forma de uma potência de 10 (por exemplo: 1 mg/g = 10⁻³).

Na tabela 6 estão apresentados alguns exemplos de coeficientes de variação para métodos quantitativos.

Tabela 6: Exemplos de CV de reprodutibilidade para métodos analíticos.

Fracção mássica	CV de reprodutibilidade (%)
1 µg/kg	45*
10 µg/kg	32*
100 µg/kg	23
1000 µg/kg	16

*Para concentrações inferiores a 100 µg/kg, a equação de Horwitz apresenta valores de CV muito elevados. Como tal, para concentrações abaixo deste nível o CV deverá ser o mais baixo possível.

Em condições de repetibilidade o CV deve situar-se até dois terços dos valores referidos acima para a reprodutibilidade.

2.5.5. Especificidade/Especificidade

Este parâmetro consiste na verificação da existência de compostos interferentes que possam comprometer a capacidade do método em identificar os analitos. É de extrema importância que o método seja capaz de distinguir entre os compostos desejados e outras substâncias semelhantes (isómeros, metabolitos, substâncias endógenas, componentes da matriz, entre outras). Um apropriado e representativo número de amostras brancas deve ser analisado, de modo a verificar a presença e o efeito desses possíveis interferentes.

2.5.6. Robustez

Os estudos de robustez consistem na determinação de factores que possam influenciar o desempenho da metodologia e, conseqüentemente, os resultados. Factores como o analista, a temperatura ou variações de pH, entre outros, podem ser críticos. Para tal, durante o processo de validação, a robustez do método é determinada introduzindo, deliberadamente, pequenas variações e observando as suas conseqüências.

Durante a verificação da especificidade do método, é possível estudar a robustez em relação à espécie animal das amostras de músculo. É igualmente viável a observação da influência desses factores críticos durante o processo de desenvolvimento e optimização do método.

Na descrição de cada metodologia, é recomendável que se identifique em que condições esta é aplicável e em quais os resultados podem estar comprometidos.

2.5.7. Estabilidade

Os testes de estabilidade têm por objectivo analisar a validade dos analitos, em solução e na matriz. No caso de existir já publicado este tipo de estudos, não é necessário incluir este parâmetro na validação.

2.5.8. Aplicabilidade

Na caracterização do método deve ser especificada a sua aplicabilidade, no que diz respeito aos tipos de matriz e às espécies animais para as quais a metodologia é validada. Este parâmetro está de certa forma já contemplado no estudo de robustez, quando se faz a análise em relação à espécie animal. Em relação à matriz, este método aplica-se apenas a amostras de músculo – como tal, não é necessário estudar a aplicabilidade a outras matrizes.

2.5.9. Limite de detecção – LD

O limite de detecção de um método refere-se ao teor mínimo a partir do qual é possível detectar a presença do analito, ou seja, a mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra.

Em termos quantitativos, o LD é determinado pela seguinte equação^[35]:

$$LD = \mu_0 + k \cdot \sigma_0 \quad (\text{equação 6})$$

Em que μ_0 é a média do teor obtido numa série de dez a 20 brancos e σ_0 o desvio-padrão associado a μ_0 . Partindo do princípio que a distribuição de μ_0 é gaussiana e de forma a ter um nível de confiança de 99,7 por cento, a constante k é de 3,3.

2.5.10. Limite de quantificação – LQ

O limite de quantificação de um método corresponde à mínima concentração medida do analito a partir do qual é possível quantificar. Em geral, o LQ pode ser considerado o ponto mínimo da recta de calibração do analito, isto quando se trabalha em níveis baixos de concentrações, aplicando-se geralmente a compostos proibidos.

O LQ pode ser calculado aplicando a equação 7^[35]:

$$LQ = \mu_0 + 10 \cdot \sigma_0 \quad (\text{equação 7})$$

Mais uma vez, μ_0 é a média do teor obtido numa série de dez a 20 brancos e σ_0 o desvio-padrão associado a μ_0 .

A confirmação dos valores calculados, tanto para o LQ como para o LD, deve ser efectuada com a fortificação de dez a 20 amostras brancas aos níveis determinados, de forma a garantir que os limites calculados são valores reais.

3. Parte experimental

Nos pontos seguintes está descrita toda a parte experimental referente aos materiais, reagentes, equipamentos utilizados assim como o procedimento desenvolvido durante este estudo e a sua validação.

3.1. Materiais

Para além do material de vidro corrente em laboratório, foram utilizados tubos de centrifuga, com capacidade de 50 mL, micropipetas de volume variável, colunas de extracção em fase sólida OASIS HLB (3cc, 60 mg), agitadores vortex e reax, centrifuga, evaporador turbovap, balanças analíticas, potenciómetro e *vials* para HPLC. Para preparação das fases móveis foram utilizados um sistema de filtração de eluentes e filtros de membrana de 13 mm, 0.45 µm, PVDF. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Zorbax XDB-C18 (SB aq), 2,1 x 150 mm, 3.5 µm e a pré-coluna uma Zorbax SB aq, 2,1 x 12,5 mm, 5µm. O sistema de LC-MS/MS é composto por: um HPLC da marca Agilent, modelo 1100, composto por bomba binária e tabuleiro de solventes, injector automático de volume variável e forno para colunas e um detector de massas PE Sciex API 2000, da Applied Biosystems.

3.2. Reagentes e padrões

Durante a análise, foram unicamente utilizados reagentes de grau analítico p.a. No caso dos reagentes utilizados para as fases móveis utilizaram-se reagentes com grau de pureza indicado para HPLC e água ultrapura do tipo I.

A ampicilina (Sigma), sob a forma de sal sódico, possui grau de pureza $\geq 98\%$; a amoxicilina (Sigma), sob a forma tri-hidratada, possui grau de pureza $\geq 99\%$. Os padrões: ácido 5R,6R-amoxicilóico, ácido 5S,6R- amoxicilóico e amoxicilina dicetopiperazina foram cedidos pela GlaxoSmithKline.

3.3. Soluções

Durante a execução do procedimento extractivo foram utilizadas uma solução de hidróxido de potássio 1M, solução tampão fosfato 0,2 M a pH 8,2 com 2% de cloreto de sódio e solução de cloreto de sódio 2%. Para fase móvel foi preparada uma solução de ácido fórmico a 0,1% em água.

As soluções padrão, para a amoxicilina e ampicilina, foram obtidas pela dissolução dos compostos em água. Prepararam-se soluções mãe de cada um dos padrões a 1000 µg/mL, soluções intermédias a 100 µg/mL e, finalmente, soluções de trabalho a 10 µg/mL. Estas soluções padrão foram armazenadas a (-) 20°C.

3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Extracção

Pesaram-se 2 g de amostra de músculo, previamente homogeneizado, para um tubo de centrífuga. Adicionou-se padrão interno (solução de trabalho de ampicilina), de modo a ficar com 50 µg/kg, e fortificaram-se as amostras brancas (ABF) com solução de trabalho de amoxicilina conforme a seguinte tabela.

Tabela 7: Volume a adicionar de solução de trabalho de ampicilina e amoxicilina por forma a construir a recta de calibração.

C (µg/kg) em amostras brancas	Volume (µl) da solução de trabalho de amoxicilina	Volume (µl) da solução de trabalho de ampicilina
0	-	10
25	5	10
50	10	10
75	15	10
100	20	10
250	50	10

Após fortificação, as amostras foram agitadas no vortex e deixadas em repouso durante dez minutos. Adicionou-se 10 mL de tampão fosfato 0.2M pH8.2 com 2% de cloreto de sódio e agitou-se novamente no vórtex. Os tubos foram colocados no reax e deixados em agitação durante dez minutos. Centrifugou-se durante 15 minutos a 5000 rpm e, para novo tubo, foi retirado o sobrenadante, evitando, quando aplicável, a camada de gordura.

3.4.2.Purificação

As colunas de extração OASIS foram acondicionadas com: 3 mL de metanol, 3 mL de água e, por fim, 1 mL de cloreto de sódio a 2%. Fez-se passar o extracto da amostra e depois as colunas foram lavadas com 2 mL de água. Secou-se em vácuo e eluiu-se com 2 mL de acetonitrilo.

Seguidamente, o extracto foi evaporado à secura, sob corrente suave de azoto.

Redissolveu-se em 400 µl de água e filtrou-se para *vials* de HPLC.

3.4.3.Identificação por LC-MS/MS

Na tabela 8 estão presentes as condições de trabalho do HPLC. Relativamente à detecção por MS/MS, esta foi conseguida utilizando uma fonte de ionização ESI em modo positivo, a uma temperatura de 450°C e voltagem de 5500 V. A aquisição dos dados foi efectuada por MRM.

As transições monitorizadas para a amoxicilina e ampicilina, assim como as energias de colisão associadas, estão representadas na tabela 9.

Tabela 8: Condições de funcionamento do HPLC.

Fluxo	250 µL/minuto		
Volume de injeção	50 µL		
Temperatura da coluna	30° C		
Fases móveis	Fase móvel A – ácido fórmico 0,1%, em água Fase móvel B – acetonitrilo		
Gradiente	T (minutos)	%A	%B
	5	98	2
	0	98	2
	1	98	2
	1.1	80	20
	3	80	20
	3.1	50	50
	8	50	50
	8.1	98	2
	12	98	2

Tabela 9: Condições de fragmentação do MS/MS. O ião-produto que se encontra a sublinhado corresponde à transição mais intensa.

Composto	lão precursor (m/z)	lão-produto (m/z)	Energia de colisão
Amoxicilina	366	<u>114</u>	29
		349	30
Ampicilina	350.10	106	41

3.5. Procedimento de validação

De modo a minimizar o número de amostras analisadas durante todo o processo de validação, esta foi projectada de forma a combinar as experiências efectuadas para a determinação dos diferentes parâmetros^[2].

No procedimento de validação, as grandezas analíticas medidas são: tempo de retenção do analito e do padrão interno; intensidade do sinal do ruído de fundo na ausência de sinal; intensidade do sinal do analito e do padrão interno. Todos os cálculos foram feitos com tempos de retenção relativos (TRR) e razões de intensidades entre o analito e o padrão interno.

Selectividade/especificidade

Analisaram-se 20 amostras brancas, seguindo toda a metodologia a validar. Verificou-se se, no tempo de retenção esperado, se observa a presença de algum interferente que possa conduzir a uma falsa identificação do composto ou que impeça a sua identificação.

LD e LQ

Analisaram-se 20 amostras brancas, determinou-se a média das intensidades observadas e o desvio-padrão correspondente. Aplicaram-se as equações 6 e 7 para o cálculo destes parâmetros.

Robustez

Analisou-se o historial referente ao desenvolvimento da metodologia, de forma a identificar possíveis factores que pudessem influenciar os resultados. Para complementar o estudo da robustez do método, analisou-se a aplicabilidade e a estabilidade do analito.

Aplicabilidade

Uma vez que este método se aplica apenas a músculo, verificou-se a aplicabilidade a várias espécies. Para tal, analisaram-se 20 amostras brancas de diferentes espécies. Depois de verificar a selectividade e a especificidade para as diferentes espécies pode-se concluir sobre a aplicabilidade do mesmo.

Estabilidade

De forma a conhecer a estabilidade da amoxicilina e as condições em que se dá a sua degradação, sujeitou-se o composto, a variações de pH e de temperatura, de acordo com a tabela 10. A solução de amoxicilina foi ajustada de forma a ter porções com pH 1, 3, 5 e 10. Cada uma destas soluções foi dividida em 4 tubos e cada um deles colocado a diferentes condições de temperatura: 2-8°C, temperatura ambiente (cerca de 22°C), 37°C e 55°C.

A concentração escolhida para este trabalho foi a da solução de trabalho de amoxicilina.

Tabela 10: Matriz de ensaios efectuados para o estudo de estabilidade variando o pH e a temperatura.

	2 a 8° C	22° C	37° C	55° C
pH 1	A1	A2	A3	A4
pH 3	B1	B2	B3	B4
pH 5	C1	C2	C3	C4
pH 10	E1	E2	E3	E4

Veracidade/recuperação

Uma vez que, no presente estudo, não havia disponível material certificado de referência, procedeu-se apenas à determinação da recuperação. Para tal, fortificaram-se 6 ABR nas seguintes concentrações: $\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR. Analisaram-se as amostras pelo procedimento a validar e calculou-se a concentração final para cada amostra. Calculou-se a recuperação (equação 3) e verificou-se se se encontra dentro dos valores aceitáveis (tabela 5).

Precisão

Para a determinação da repetibilidade:

- Preparou-se um conjunto de amostras brancas fortificadas a $\frac{1}{2}$ 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. Repetiu-se o mesmo procedimento por mais duas vezes, em dias diferentes.

Para a determinação da reprodutibilidade:

- Preparou-se um conjunto de amostras brancas fortificadas a $\frac{1}{2}$ LMR, LMR e 1,5 LMR. Para cada nível, fizeram-se seis 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.

Os valores de repetibilidade e de reprodutibilidade foram confrontados com os valores aceitáveis, de acordo com a equação de Horwitz (equação 5).

Limite de decisão - CC α e capacidade de detecção - CC β

Analisar 20 amostras brancas fortificadas ao nível do LMR e aplicar o procedimento analítico completo. Recorrer às equações apresentadas anteriormente para o cálculo das intensidades correspondentes a cada parâmetro (equações 1 e 2).

Calcular o CC α e o CC β recorrendo a curvas de calibração fortificadas, conforme se apresenta do ponto seguinte.

Curvas de calibração fortificadas

Construir três curvas de calibração com seis níveis de concentração, incluindo o ponto zero, fortificando amostras brancas (conforme tabela 11). As três curvas devem ser feitas em dias diferentes e variando o operador.

Tabela 11: Níveis de fortificação para as rectas de calibração em amostras brancas.

	Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Réplicas
ABR	0	1
ABF 1	$\frac{1}{2}$ LMR = 25	6
ABF 2	LMR = 50	6
ABF 3	1,5 LMR = 75	6
ABF 4	2 LMR = 100	1
ABF 5	5 LMR = 250	1

4. Apresentação e Discussão dos Resultados

4.1. Desenvolvimento da metodologia analítica

O desenvolvimento de uma metodologia eficaz e robusta para a detecção e quantificação da amoxicilina em amostras biológicas é uma tarefa difícil devido à natureza polar e anfoterica desta molécula^[45,58].

Tendo em conta estas características do composto, o desenvolvimento do procedimento de extracção a partir de matrizes biológicas, demonstrou alguma complexidade pela co-extracção de compostos endógenos existentes na matriz com características de polaridade semelhantes que interferiam na extracção e purificação da amoxicilina bem como na sua detecção por aumento significativo do ruído de fundo. Há também a considerar que em ambientes muito ácidos ou muito básicos se observa a degradação da molécula.

De acordo com a bibliografia consultada optou-se pela utilização de um tampão fosfato a pH 8.2 por ser referenciado pela maioria dos autores como o mais adequado^[21,36,46,57,60]. A estabilidade dos resultados obtidos, nomeadamente durante todo o processo de validação, comprovou tratar-se de um bom ambiente extractivo. A utilização de cloreto de sódio, ao provocar o fenómeno de *salting out* ocasionando uma maior precipitação das proteínas hidrofílicas presentes na matriz, proporciona um extracto mais limpo^[58].

Relativamente à extracção em fase sólida, a maioria dos trabalhos publicados consultados descreve a utilização de colunas de C18^[21,36,46,60]. Dados os maus resultados obtidos com este tipo de coluna, nomeadamente no que se refere à pouca fluidez em termos de fluxo após aplicação do extracto, na frequente colmatação da coluna por resíduos de matéria orgânica oriunda da matriz, bem como na fraca recuperação observada, foram experimentados outros tipos de colunas para tentar melhorar as condições extractivas. A utilização do enchimento do tipo OASIS[®] HLB (do inglês *hidrofilic-lipofilic balance*) demonstrou ser o mais eficiente no estudo efectuado de optimização das condições de extracção em fase sólida. Foi observado uma maior fluidez em termos de fluxo, bem como uma muito menor incidência da colmatação do enchimento da coluna durante o procedimento extractivo de amostras mais complexas.

Igualmente, o extracto obtido demonstrou ser muito mais limpo de compostos interferentes possibilitando uma razão sinal/ruído muito maior ganhando-se em sensibilidade e especificidade. Na figura 14 estão representados os cromatogramas iónicos referentes a duas amostras brancas fortificadas ao nível do LMR em que uma delas foi extraída utilizando uma coluna C18 e outra com uma coluna OASIS[®] HLB. Pela observação dos cromatogramas é possível observar que a amostra extraída em coluna OASIS[®] HLB demonstra um menor ruído de fundo biológico bem como evidencia um clara ganho nem termos de recuperação.

A utilização de um padrão interno adequado, ou seja, a forma estável do composto isotopicamente marcado ou outro que apresente uma semelhança estrutural é recomendada pois permite verificar a eficiência da extração e obter uma quantificação mais real. Igualmente permite verificar os critérios estabelecidos no que se refere à identificação do composto nomeadamente a verificação do tempo de retenção relativo do composto a analisar em função do padrão interno. No presente trabalho, na impossibilidade de utilizar a amoxicilina marcada, recorreu-se à penicilina mais semelhante em termos estruturais ou seja a ampicilina.

Quanto à separação cromatográfica a optimização dos parâmetros cromatográficos teve em atenção a obtenção da melhor separação possível dos compostos a analisar bem como a minimização da adsorção da amoxicilina e do padrão interno na coluna cromatográfica, por forma a se obterem picos cromatográficos de formato o mais simétrico possível.

A utilização de cromatografia líquida de fase reversa utilizando coluna de C18 e a adição de ácido fórmico a 0.1% à fase móvel de água:acetonitrilo, é referenciada por vários autores^[36,39,57,59,60,61] como a mais indicada para as penicilinas. Na realidade, esta fase móvel e a coluna de C18 demonstraram ser eficazes para os compostos a analisar. Uma vez que um dos objectivos era também a detecção dos principais metabolitos da amoxicilina, foi importante verificar que as condições utilizadas garantiam a separação cromatográfica destes compostos. Concretamente no caso da amoxicilina dicetopiperazina, que apresenta a mesma massa molecular que a amoxicilina, bem como um fragmentos mais importante, a separação destes dois compostos é um factor muito importante para a eficiente distinção dos mesmos.

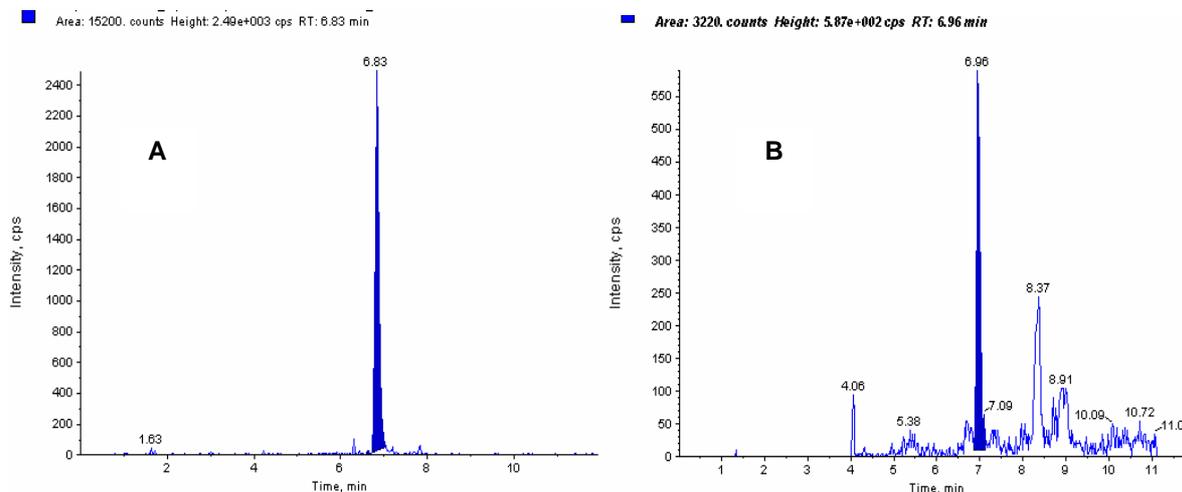


Figura 14: Cromatogramas iónicos, da transição mais intensa da amoxicilina, em duas amostras brancas fortificadas com aquele composto ao nível do LMR: [A] por extracção com coluna OASIS HLB (amoxicilina $t_r=6.83$ min) e [B] por extracção com coluna C18 (amoxicilina $t_r=6.96$ min)

Apesar da utilização de uma fase móvel ácida ($\text{pH}\approx 2,7$), a coluna utilizada, uma Zorbax SB-aq (*StableBond aqueous*), mostrou-se bastante robusta ao longo de todo o processo de optimização do método e, posteriormente, de validação. Esta coluna é considerada estável num intervalo de pH entre 1 e 8, sendo especialmente indicada para a retenção de compostos hidrofílicos quando se utilizam fases móveis com grande percentagem de fase aquosa, prevenindo o colapso da fase estacionária e deixando-a desimpedida para a retenção dos compostos.

Na detecção foi utilizado um detector de espectrometria de massa do tipo triplo quadrupolo, recorrendo a uma fonte de ionização à pressão atmosférica do tipo electrospray assistido por nebulização no modo positivo (ESI^+) como interface da cromatografia líquida e o detector de massa. A optimização dos parâmetros instrumentais para a detecção de cada um dos compostos a analisar por monitorização de reacções múltiplas (MRM), foi efectuada pela injeção directa na fonte de ionização de solução de concentração a $10 \mu\text{g/mL}$ de cada um dos compostos.

Preferiu-se a ionização em modo positivo uma vez que, em modo negativo os sinais obtidos eram de intensidade muito inferior. A utilização de ESI em modo negativo poderia impossibilitar a quantificação da amoxicilina ao nível do LMR.

Na figura 15 está representado o espectro de massa da amoxicilina obtido por electrospray no modo positivo (ESI⁺). Na figura 16 o espectro de massa obtido por espectrometria de massa sequencial da molécula protonada amoxicilina (m/z=366) com identificação dos fragmentos iónicos mais intensos obtidos.

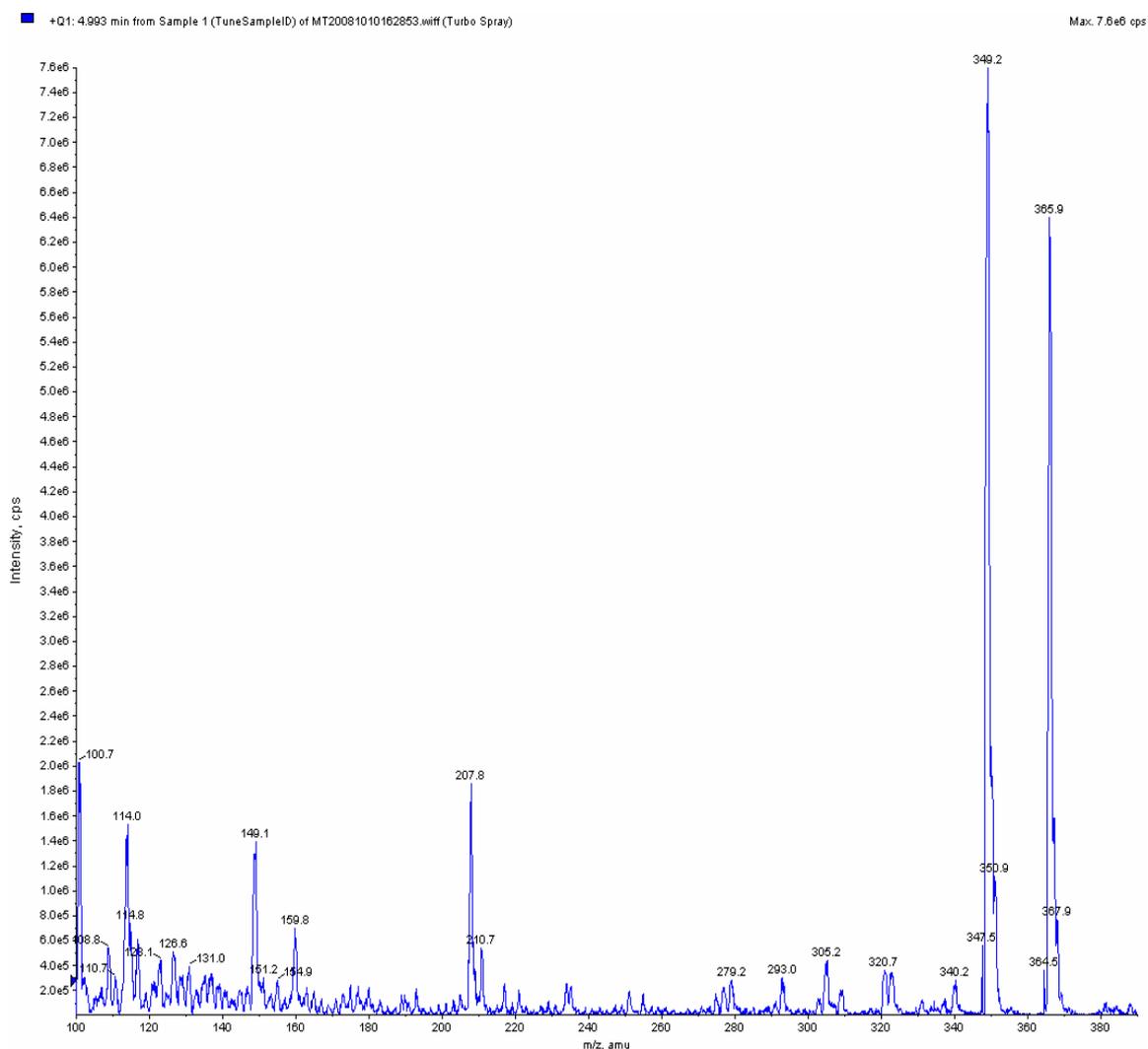


Figura 15: Espectro massa da amoxicilina em ESI⁺.

+MS2 (365.97): 3.518 to 4.003 min from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20081010155719.wiff (Turbo Spray) Max. 2.1e5 cps

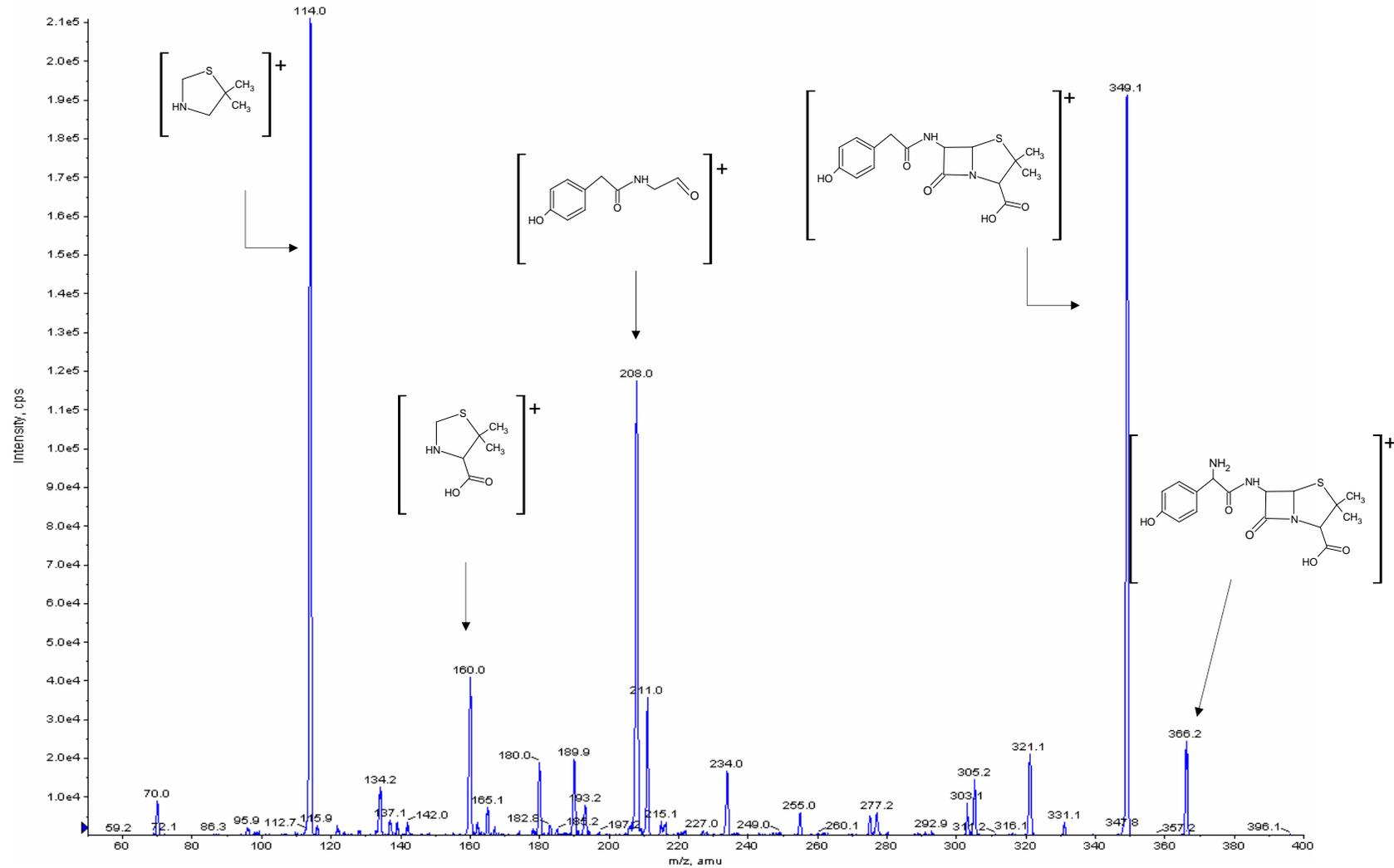


Figura 16: Espectro de massa da fragmentação da molécula protonada da amoxicilina obtido por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos obtidos.

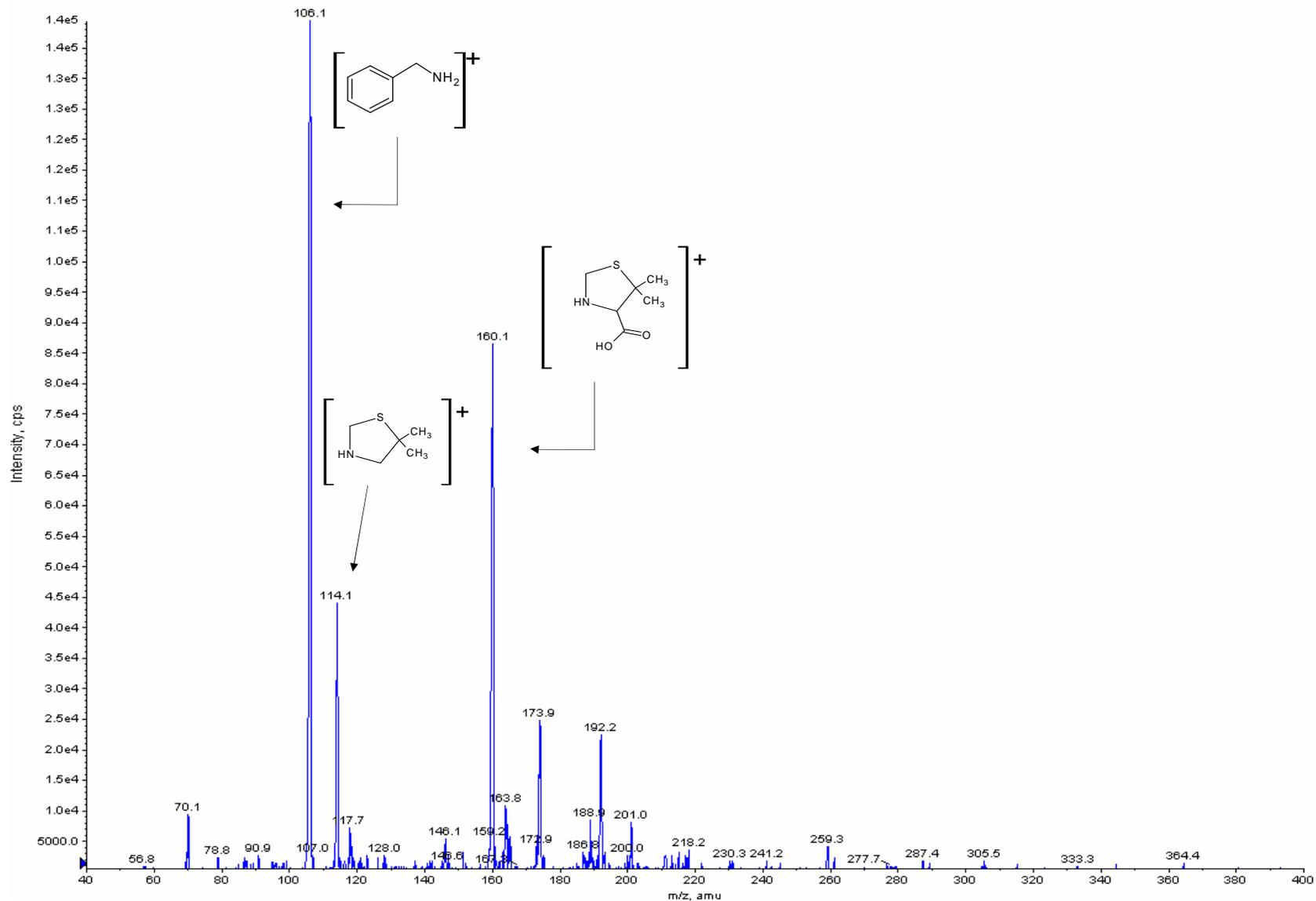


Figura 17: Espectro de massa por espectrometria de massa sequencial da ampicilina com ilustração dos fragmentos principais.

Na figura 17 o espectro de massa da fragmentação da molécula protonada da ampicilina obtido por espectrometria de massa sequencial com a identificação dos principais fragmentos obtidos.

A fragmentação de todas as penicilinas tem como resultado, primeiramente, a abertura do anel β -lactâmico. O ião produto m/z 160 $[C_6H_9NO_2S+H]^+$ é específico para todos os compostos desta classe. No caso da amoxicilina os três fragmentos iônicos mais importantes são o m/z 208 resultante da quebra do anel, ou seja, $[M+H-C_6H_9NO_2S]^+$, o fragmento m/z 349 resultante da perda de um grupo amónia $[M+H-NH_3]^+$ do ião precursor, e o m/z 114 correspondente ao primeiro indicado com perda do grupo carboxilo $[C_6H_9NO_2S-COOH]^+$, sendo este também comum à maioria das penicilinas.

Na figura 18 está representada a fragmentação da amoxicilina com indicação dos fragmentos principais que foram ilustrados e identificados na figura 16.

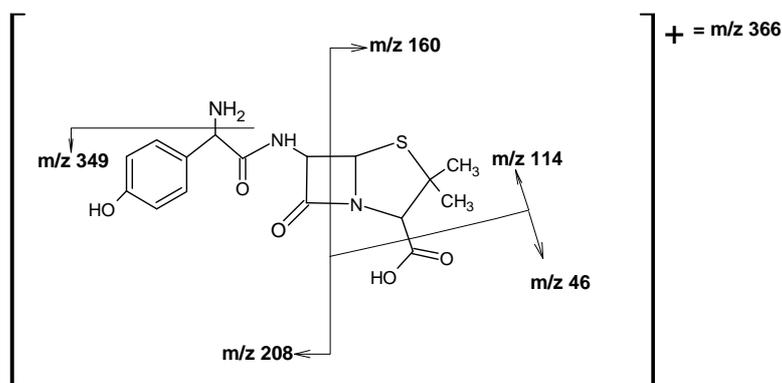


Figura 18: Estrutura molecular da amoxicilina e principais fragmentos.

As duas transições iónicas (ião precursor>ião produto) escolhidas para a quantificação da amoxicilina foram m/z 366>114 e m/z 366>349, uma vez que são as que resultam num sinal mais intenso em MRM.

No caso da ampicilina, uma vez que é somente utilizada como padrão interno, apenas uma transição foi monitorizada, a mais intensa (m/z 350>106).

Na figura 19 apresentam-se os cromatogramas iónicos obtidos pela monitorização das transições iónicas utilizadas para a detecção da amoxicilina e da ampicilina utilizadas no presente método.

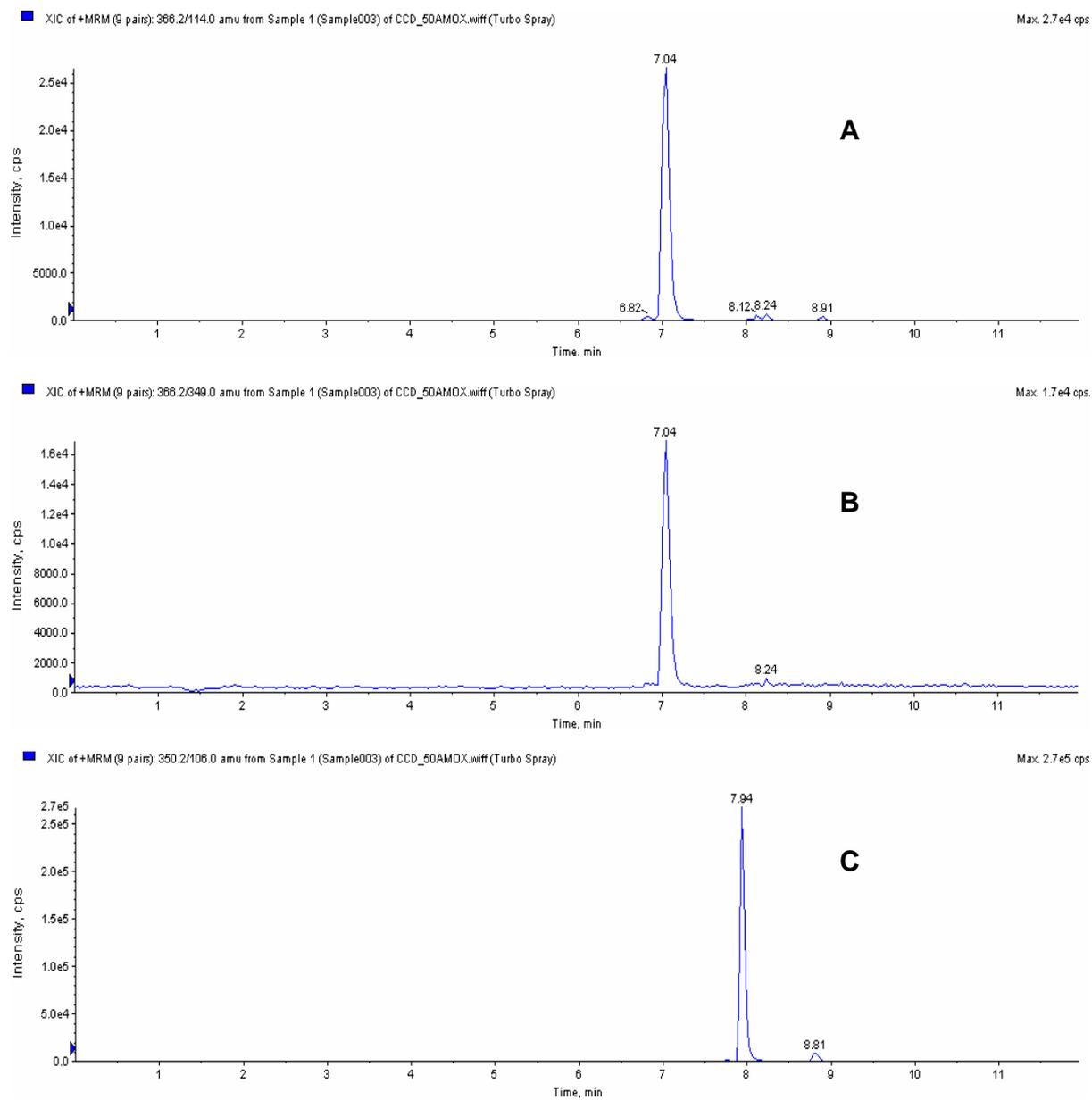


Figura 19: Cromatogramas das transições iônicas monitorizadas para a amoxicilina e ampicilina. O cromatograma A corresponde à transição mais intensa da amoxicilina (m/z 366>114), B corresponde à 2ª transição da amoxicilina (m/z 366>349). O cromatograma C é referente à transição monitorizada para a ampicilina (m/z 350>106).

4.2. Estudo dos produtos de degradação

Durante o estudo efectuado relativo à estabilidade/degradação da amoxicilina foram detectados vários produtos de degradação de acordo com o descrito por vários autores^[20,21,22,23,24]. Comprovou-se que existe degradação do composto em solução quando submetido a condições agressivas de pH e temperatura com a formação do ácido amoxicilóico (formam-se os dois isómeros) e da amoxicilina dicetopiperazina (ver estudo de estabilidade nos resultados da validação). Estes compostos estão referenciados^[20,21] como sendo os principais metabolitos da amoxicilina e como tal, foram introduzidos no método apenas com o intuito de simular a sua formação ao sujeitar a amoxicilina a condições que conduzam à sua degradação.

Dado o interesse na inclusão destes produtos de degradação no procedimento de análise, tornava-se fundamental otimizar as condições cromatográficas e de detecção para estes compostos. Por intervenção junto da GlaxoSmithKline foi possível obter gratuitamente os respectivos padrões desses compostos. Da mesma forma que foi efectuado com a amoxicilina e ampicilina, os parâmetros de detecção foram otimizados pela infusão directa de soluções do ácido amoxicilóico e da amoxicilina dicetopiperazina numa concentração de 10 µg/mL. Nas figuras 20 e 21 estão representados os espectros de massa por MS/MS para o ácido amoxicilóico e para a amoxicilina dicetopiperazina. Estão igualmente representados os principais fragmentos monitorizados para cada composto. O modo de fragmentação verificada nestes compostos é muito semelhante ao descrito para a amoxicilina.

A separação entre a amoxicilina e a amoxicilina dicetopiperazina foi eficaz não havendo o problema de cada uma das moléculas se tornar um interferente da outra. Relativamente aos dois isómeros do ácido amoxicilóico obteve-se também uma separação cromatográfica bastante segura sendo possível, caso se aplique no futuro, fazer a quantificação dos dois compostos separadamente. Na figura 22 é possível comprovar a separação dos compostos referidos.

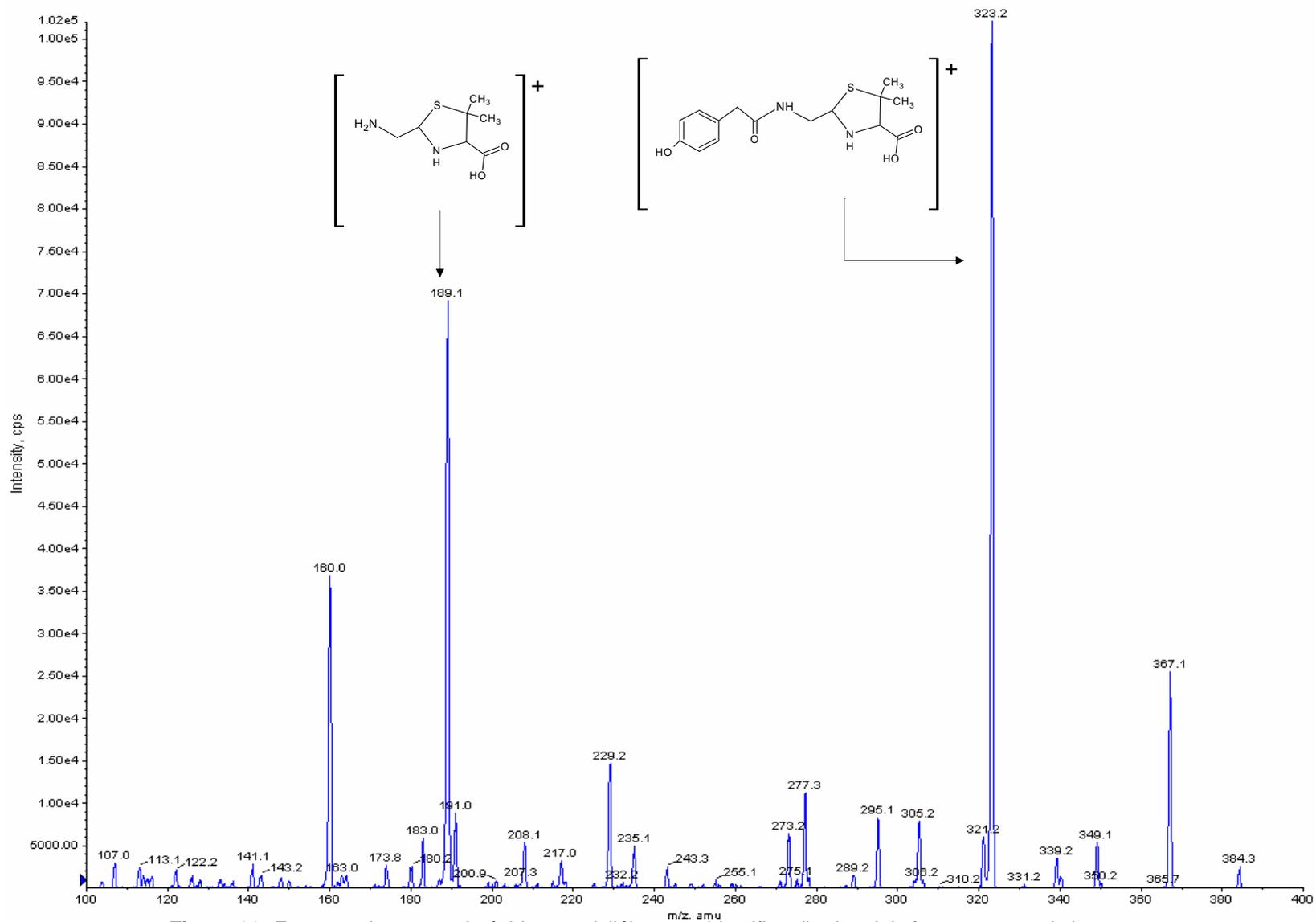


Figura 20: Espectro de massa do ácido amoxicílico com identificação dos dois fragmentos mais intensos.



Figura 21: Espectro de massa da amoxicilina diketopiperazina com identificação dos dois fragmentos mais intensos.

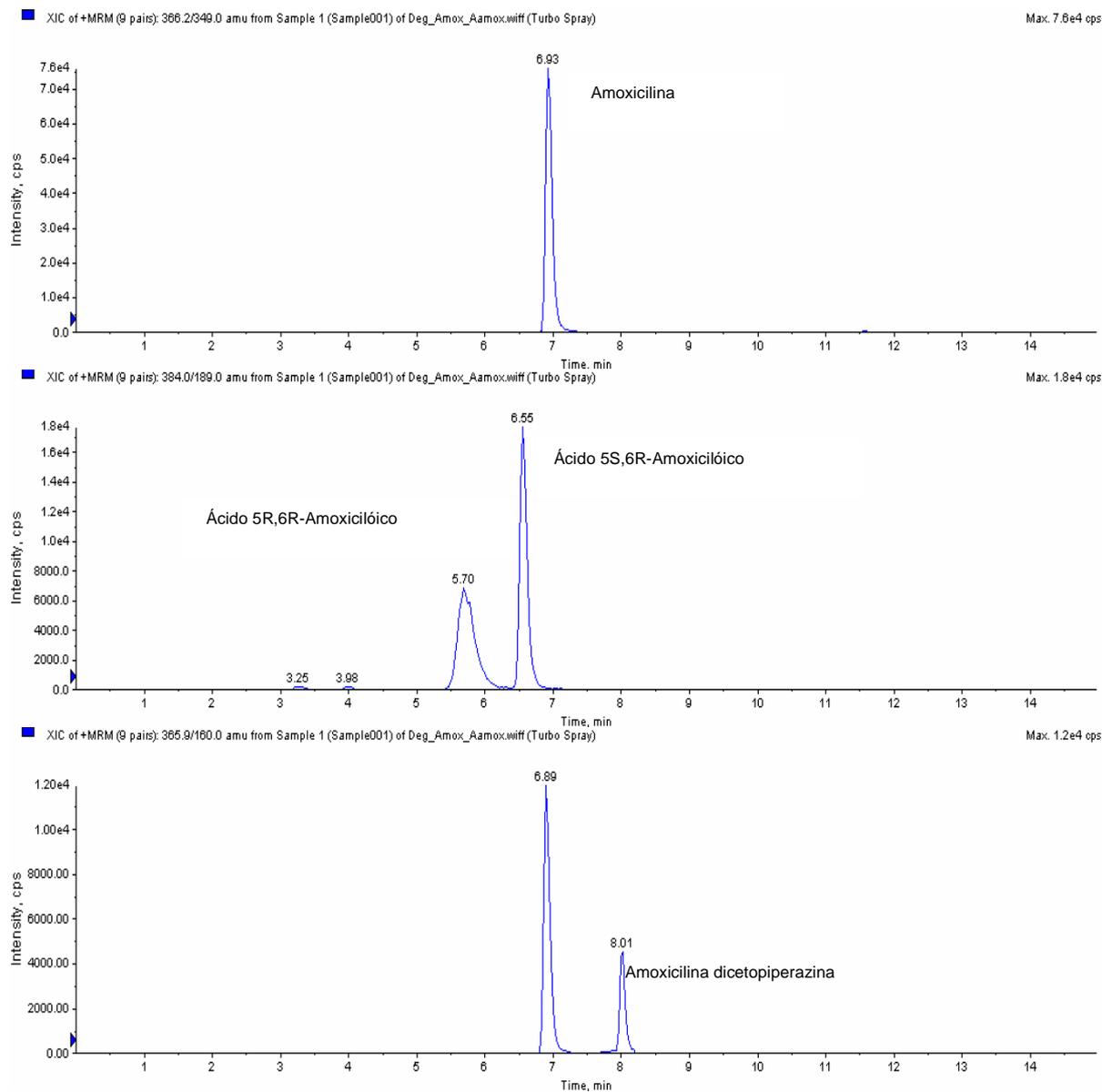


Figura 22: Cromatogramas de uma das transições controladas para a amoxicilina (m/z 366>349), ácido amoxicilóico (m/z 384>189) e amoxicilina dicetopiperazina (m/z 366>160) numa mistura de padrões a 50 µg/kg.

4.3. Validação

O desempenho do método para a detecção e quantificação da amoxicilina foi verificado através do estudo de validação tendo em conta os critérios da Decisão da Comissão 2002/657/CE [2]. Tal como foi referido anteriormente, algumas experiências foram agrupadas de forma a minorar o número de amostras analisadas ao longo de todo o processo. Na tabela 12 estão esquematizados os ensaios efectuadas ao longo da validação e o modo como foram agrupados.

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.

Tal como já foi referido, todas as determinações foram efectuadas tendo por base a área do pico cromatográfico da transição iónica menos intensa (m/z 366>349) obtido para a amoxicilina.

Tabela 12: Plano de amostras para o processo de validação.

Concentração $\mu\text{g}/\text{kg}$	Parâmetro	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
		Número de ensaios			
0	Selectividade Especificidade Robustez Aplicabilidade	20			
50	CC α e CC β	20			
0	CC α e CC β		1	1	1
25	CC α e CC β Repetibilidade Reprodutibilidade Recuperação		6	6	6
50	CC α e CC β Repetibilidade Reprodutibilidade Recuperação		6	6	6
75	CC α e CC β Repetibilidade Reprodutibilidade Recuperação		6	6	6
100	CC α e CC β		1	1	1
250	CC α e CC β		1	1	1

4.3.1. Selectividade/Especificidade/Aplicabilidade

As 20 amostras brancas analisadas demonstraram a inexistência de qualquer interferente que pudesse comprometer a identificação inequívoca do composto. Nesta experiência introduziu-se a variação de espécie, ou seja, dentro das 20 amostras havia variação de espécie animal (aves, bovinos, suínos, caprinos) de forma a comprovar a aplicabilidade do método. A inexistência de interferentes foi evidente em todas as amostras.

Este facto é evidente pela observação comparativa entre os cromatogramas das amostras brancas e das fortificadas com o composto. A figura 23 apresenta cromatogramas que evidenciam esse facto.

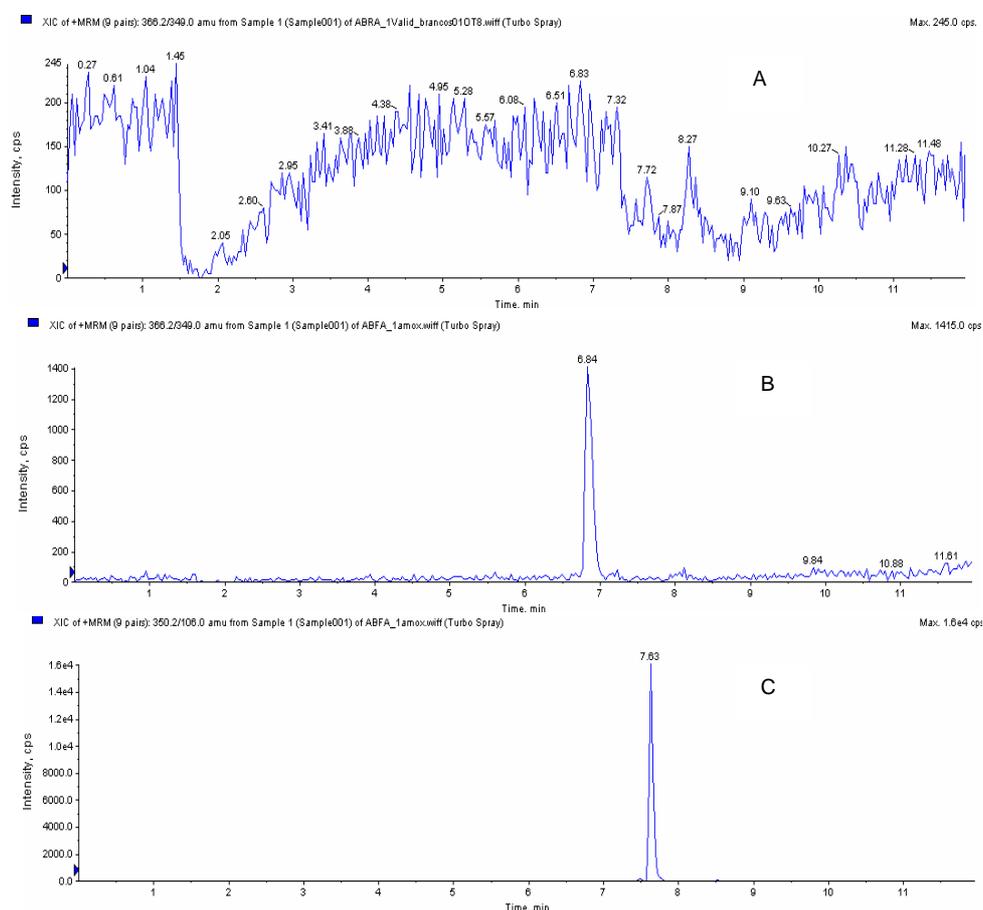


Figura 23: Cromatogramas em que A e B são referentes à transição iónica m/z 366>349 da amoxicilina de uma amostra branca e de uma amostra branca fortificada a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($t_r=6,84$), respectivamente. O cromatograma C refere-se ao padrão interno ($t_r=7,63$).

4.3.2. Robustez

No processo de desenvolvimento do procedimento analítico, os factores considerados potencialmente críticos foram: pH da solução de extracção, colunas para extracção em fase sólida e o operador. O intuito de verificar cada um destes factores foi o de comprovar se pequenas alterações do procedimento podem afectar ou não o desempenho do método.

Para a verificação da importância de pequenas variações do pH da solução tampão utilizada na extracção, definiu-se um intervalo de pH entre 7.5 e 8.5. Foi observado que nos limites do intervalo estabelecido, não se obtiveram alterações aos resultados observados quando comparados com aquele obtido ao pH definido no procedimento adoptado.

Relativamente à extracção em fase sólida, ficou já atrás demonstrado que as colunas C18 tradicionalmente utilizadas por vários autores não têm a mesma eficiência que as OASIS HLB utilizadas neste método.

No que diz respeito ao operador a variação deste factor foi introduzida durante a execução das 3 curvas de calibração de forma intercalada (operador A e operador B). A avaliação das curvas de calibração, apresentada mais à frente, comprovou que não há qualquer influência do operador que executa a análise. Todas as curvas apresentaram correlação linear e declive semelhante entre si.

4.3.3. Estabilidade

O estudo de estabilidade realizado para a amoxicilina, incluiu variações de pH e de temperatura durante 170 horas.

Deste estudo foi possível verificar as seguintes observações:

- A pH 1 com variação de temperatura ao longo de 170 horas é visível que um aumento da temperatura ocasiona um aumento da degradação da amoxicilina, sendo esta degradação crítica a partir dos 37°C, conforme se pode constatar na figura 24.

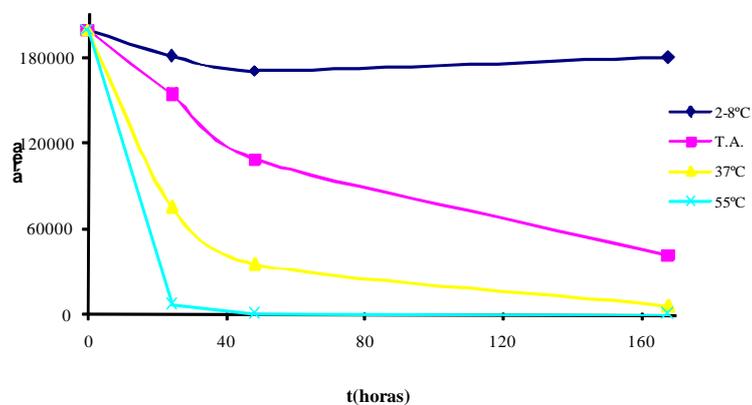


Figura 24: Perfil de variação, em áreas, da amoxicilina a pH 1 a várias temperaturas.

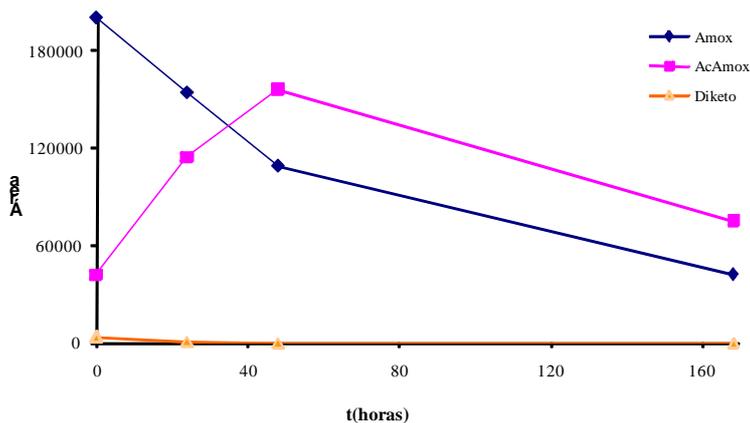


Figura 25: Perfil de variação, em áreas, da amoxicilina e metabólitos a pH 1 a à temperatura ambiente (22°C).

- A pH 3 o comportamento é semelhante ao observado para pH 1, nota-se uma ligeira degradação do composto nas duas temperaturas mais baixas; uma degradação mais evidente a 37°C e bastante mais acentuada a 55°C. Tanto a pH 1 como a pH 3 nota-se uma maior tendência para a formação de ácido amoxicilóico à temperatura ambiente e a 37°C sendo que, nesta última situação, a concentração de ácido começa a decrescer entre as 24 e as 48 horas.
- A pH 5 o comportamento da amoxicilina é praticamente o mesmo para as duas temperaturas mais baixas: não se dá uma degradação significativa nem formação de

produtos de degradação em grande quantidade. À temperatura de 37°C já se evidencia uma ligeira perda da amoxicilina e um aumento dos produtos de degradação, em especial do ácido amoxicilóico. Com a temperatura a 55°C já é muito evidente a degradação. Na figura seguinte é possível ver o desaparecimento progressivo da amoxicilina e o crescimento dos produtos.

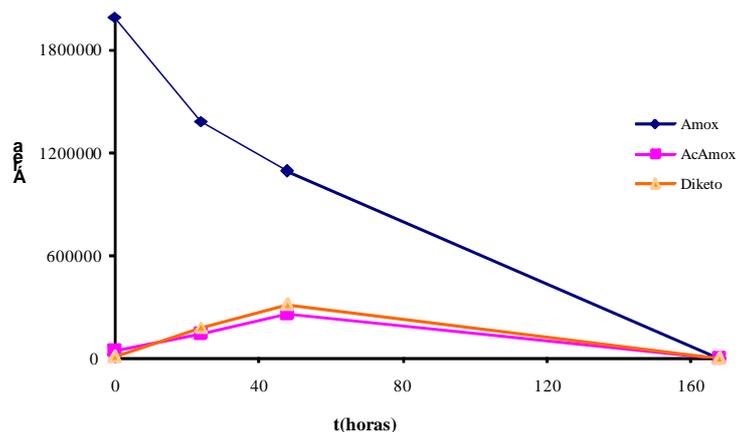


Figura 26: Perfil de variação, a pH 5 e a 55°C, das áreas dos picos da amoxicilina, ácido amoxicilóico e dicetopiperazina ao longo do tempo.

- A pH 10 a temperatura não tem grande impacto uma vez que o próprio meio alcalino provoca a degradação instantânea da amoxicilina. Os produtos de degradação que se formam acabam de desaparecer progressivamente a partir das 24 horas depois de iniciado o ensaio.

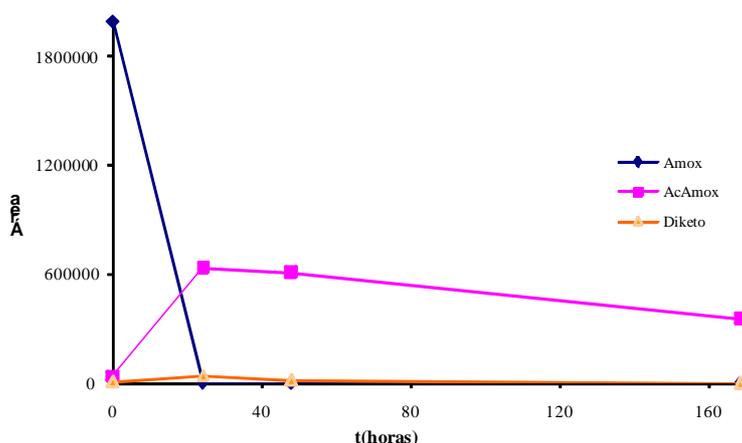


Figura 27: Perfil de variação, a pH 10 e a 2-8°C, das áreas dos picos da amoxicilina, ácido amoxicilóico e dicetopiperazina ao longo do tempo.

4.3.4. Veracidade/Recuperação

Tal como já foi referido, não foi possível determinar a veracidade do método uma vez que não estavam disponíveis matérias de referência. Como tal, procedeu-se ao cálculo da recuperação do método. A tabela 13 apresenta os resultados utilizados para o cálculo da recuperação.

Tabela 13: Dados utilizados no cálculo da recuperação do método.

	Nível 1 25 µg/kg	Nível 2 50 µg/kg	Nível 3 75 µg/kg
	Concentrações obtidas (µg/kg)		
Curva 1	25,77	46,97	72,26
	17,83	47,62	83,38
	25,14	45,61	61,21
	28,30	48,10	75,26
	24,82	47,65	72,71
	23,49	37,27	82,94
Curva 2	20,17	49,62	67,71
	19,98	47,54	74,16
	20,94	47,97	64,21
	20,55	47,63	65,49
	21,82	57,25	84,62
	20,04	52,96	82,43
Curva 3	23,28	48,24	69,32
	19,02	47,28	78,12
	23,23	46,45	62,64
	24,35	47,21	71,15
	23,47	52,34	78,58
	22,06	44,69	83,56
	Concentração média (µg/kg)		
	22,45	47,91	73,87
	Recuperação (%)		
	89,83	95,82	98,50
	Recuperação do método (%)		
	94,72		

As amostras fortificadas aos níveis 1/2LMR, LMR e 1,5*LMR foram quantificadas nas curvas de calibração. Pela aplicação da equação 3 fez-se a determinação da recuperação para cada um dos três principais níveis de fortificação. A média das 3 determinações resulta na recuperação do método.

O critério de aceitação da recuperação para métodos analíticos, de acordo com a directiva, é de -20% a +10%, para concentrações acima de 10 µg/kg. Deste modo a recuperação obtida encontra-se dentro do intervalo aceitável.

4.3.5.Precisão

Para o cálculo da repetibilidade e da reprodutibilidade utilizaram-se também os resultados apresentados na tabela 13. Ambos os parâmetros são determinados em termos de coeficientes de variação, CV em percentagem, utilizando a equação 4.

Para o cálculo da repetibilidade são estabelecidos os parâmetros σ (desvio padrão) e μ (média) para cada grupo de 6 réplicas do mesmo dia e para cada nível de concentração. Da média dos σ e μ dos 3 dias determina-se o CV. Este valor não pode ultrapassar os 2/3 do obtido através da equação de Horwitz para cada concentração. A repetibilidade do método é a média dos 3 coeficientes de variação obtidos. A tabela 14 apresenta os resultados de repetibilidade obtidos.

Tabela 14: Resultados obtidos para a determinação da repetibilidade do método.

Nível de Fortificação (µg/kg)	desvio padrão	média (µg/kg)	CV (%) obtido	CV (%) equação de Horwitz	2/3 de CV (%) equação de Horwitz	Repetibilidade do método (%)
25	2,03	24,22	9.1	27,88	18,59	9,17
50	3,53	20,58	7.4	25,12	16,74	
75	8,19	22,57	11.1	23,63	15,75	

No cálculo da reprodutibilidade os 18 resultados obtidos (6 de cada dia) são agrupados e determina-se, para o conjunto, o desvio padrão e a média, para cada nível de concentração assim como o CV. Este não deverá ultrapassar o obtido pela equação de Horwitz. Os resultados de reprodutibilidade obtidos estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15: Resultados obtidos para a determinação da reprodutibilidade do método.

Nível de Fortificação (µg/kg)	desvio padrão	média (µg/kg)	CV (%) obtido	CV (%) equação de Horwitz	Reprodutibilidade do método (%)
25	2,68	22,46	11,92	27,88	10,23
50	3,97	47,91	8,29	25,12	
75	7,74	73,87	10,47	23,63	

De acordo com os resultados apresentados é evidente que tanto em condições de repetibilidade como de reprodutibilidade o método responde dentro dos critérios de aceitação estabelecidos.

4.3.6. Limite de decisão - $CC\alpha$ e capacidade de detecção - $CC\beta$

O cálculo do $CC\alpha$ e do $CC\beta$ foi efectuado em cada um dos três dias das curvas de calibração. Partindo da concentração de interesse, 50 µg/kg, e do desvio padrão verificado nas 20 amostras fortificadas a esse nível, aplicaram-se as equações 1 e 2 atrás referidas para o cálculo das intensidades referentes a $CC\alpha$ e do $CC\beta$. Através das equações das curvas de calibração obtidas para cada um dos 3 dias, obtiveram-se as concentrações correspondentes.

As tabelas 16 e 17 apresentam os valores obtidos e os dados utilizados para o cálculo do $CC\alpha$ e do $CC\beta$.

Tabela 16: Razões de intensidades (área do pico da amoxicilina/área do pico da ampicilina) para as 20 amostras brancas fortificadas ao nível do LMR, média, desvio padrão e tempo de retenção relativo verificado para cada uma delas.

ABF	y (área relativa)	TRR
1	0,17	0,90
2	0,21	0,89
3	0,22	0,86
4	0,17	0,90
5	0,18	0,87
6	0,19	0,88
7	0,21	0,88
8	0,19	0,88
9	0,28	0,88
10	0,19	0,89
11	0,17	0,89
12	0,25	0,88
13	0,17	0,89
14	0,18	0,88
15	0,17	0,88
16	0,18	0,84
17	0,21	0,88
18	0,20	0,88
19	0,25	0,88
20	0,20	0,88
Média	0,20	
Desvio padrão	0,03	

Tabela 17: Intensidades e concentrações de CC α e CC β .

Iccα	0,25	
CCα	Curva 1	51,70
	Curva 2	60,42
	Curva 3	56,40
	Média	56,05
Iccβ	0,30	
CCβ	Curva 1	61,64
	Curva 2	71,75
	Curva 3	66,65
	Média	66,70

4.3.7. Estudo das curvas de calibração

De forma a validar as rectas foi estudada a linearidade e verificada a aceitação da gama de trabalho pela aplicação do teste de homogeneidade das variâncias (ver anexo B e C)^[35,55].

Relativamente à aceitação da gama de trabalho verificou-se que as diferenças das variâncias entre o ponto mais baixo de concentração (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e o mais alto (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) não são significativas. Deste modo a gama de trabalho é aceite.

Quanto à linearidade ficou também provado, pelo estudo dos desvios residuais associados às variâncias, que a curva é de regressão linear uma vez que o ajuste polinomial não se aplica. Para além disso, o laboratório estabeleceu como critério de aceitação da curva que esta tenha uma correlação de 0.99 o que também se verifica nas três curvas.

As rectas de calibração construídas nos três dias estão representadas nas figuras 28, 29 e 30 onde está evidenciada a equação e a correlação de cada uma delas.

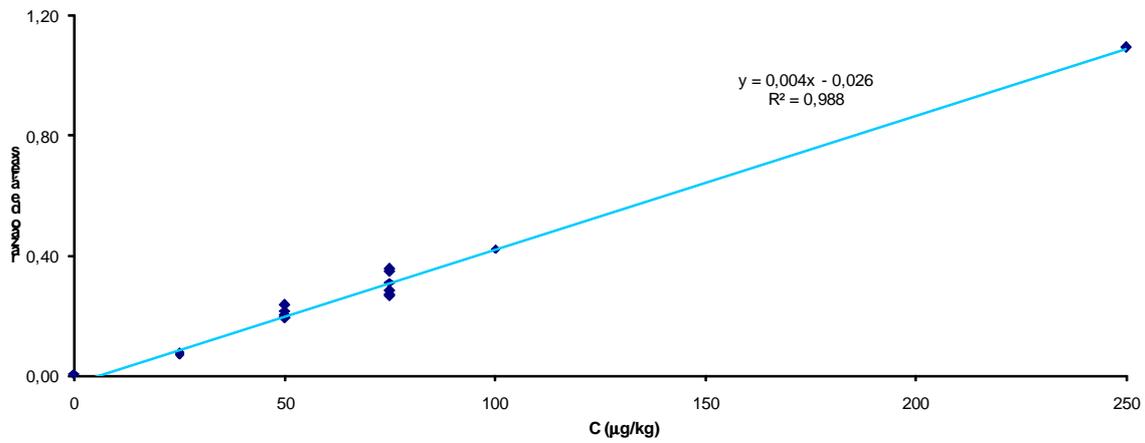


Figura 28: Recta de calibração construída em amostras brancas fortificadas, no dia 1 pelo operador A.

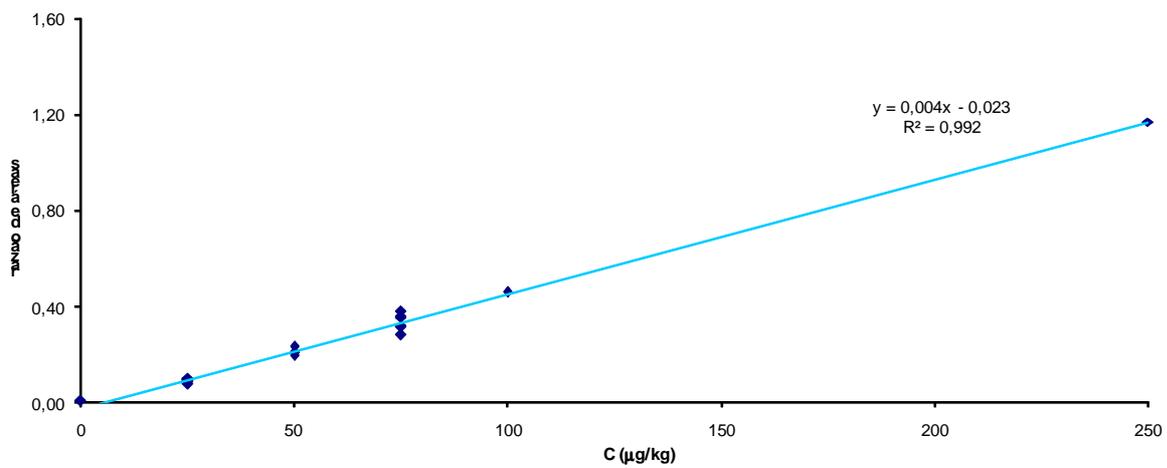


Figura 29: Recta de calibração construída em amostras brancas fortificadas, no dia 2 pelo operador B.

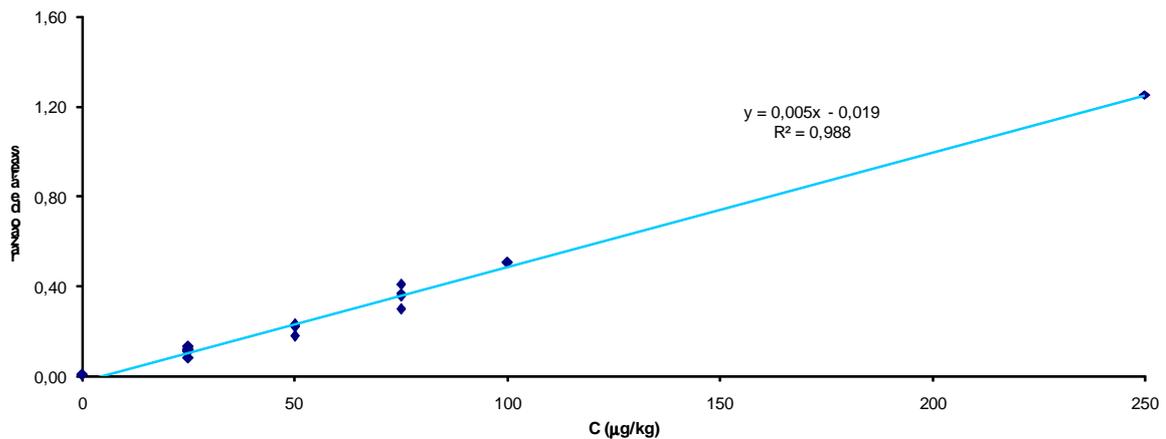


Figura 30: Recta de calibração construída em amostras brancas fortificadas, no dia 3 pelo operador A.

Mais uma vez, e relembrando o estudo de robustez quanto ao operador, pelo estudo das 3 curvas, é evidente a não influência do mesmo na execução do método analítico.

4.3.8. Limite de detecção e limite de quantificação

A determinação do LD e LQ baseou-se no estudo do sinal obtido nas 20 amostras brancas e na aplicação das equações 6 e 7. Na tabela seguinte estão apresentadas as áreas relativas para os 20 brancos.

Tabela 18: Média e desvio padrão das áreas relativas das 20 amostras brancas.

ABR	y (área relativa)
Média	0,0034
Desvio padrão	0,0017

Tabela 19: Concentrações de LD e LQ.

LD	Curva 1	3,91
	Curva 2	5,99
	Curva 3	5,04
	Média	4,98
LQ	Curva 1	6,29
	Curva 2	8,69
	Curva 3	7,57
	Média	7,52

De forma a comprovar que os valores de LD e LQ determinados através de cálculos teóricos eram efectivamente reais procedeu-se à análise de 10 amostras brancas fortificadas ao nível de LD e 10 amostras brancas fortificadas ao nível de LQ. Nas figuras seguintes apresentam-se cromatogramas aos níveis de detecção e de quantificação.

Pelos cromatogramas apresentados nas figuras 31 e 32 é possível comprovar a capacidade do método de detectar e quantificar aos níveis definidos. Todas as 10 amostras fortificadas aos níveis de LD e LQ apresentaram cromatogramas semelhantes aos apresentados.

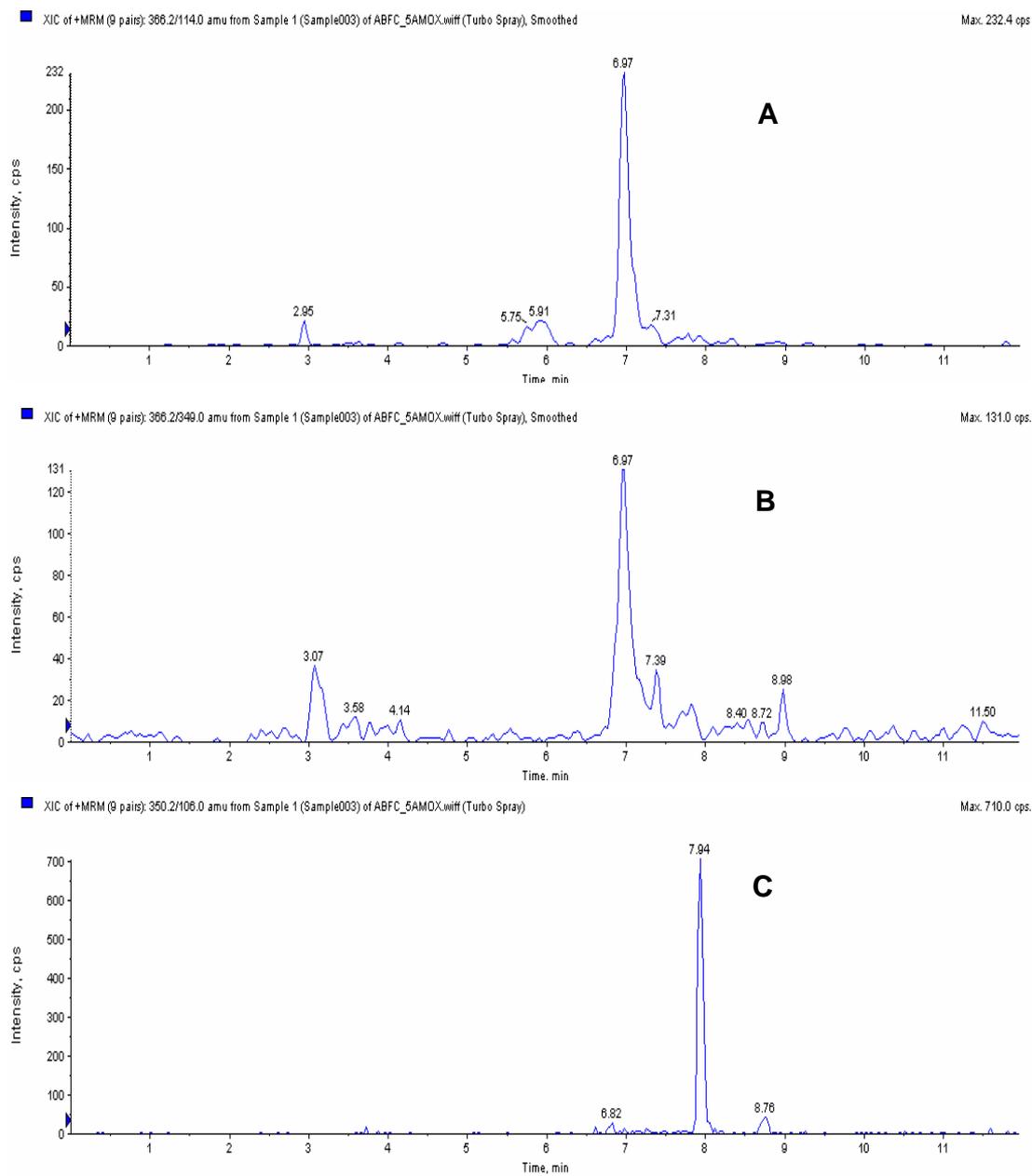


Figura 31: Cromatogramas das transições monitorizadas para a amoxicilina (A corresponde a m/z 366>114 e B a m/z 366>349) e ampicilina (C corresponde a m/z 350>106) ao nível de LD – 5 µg/kg.

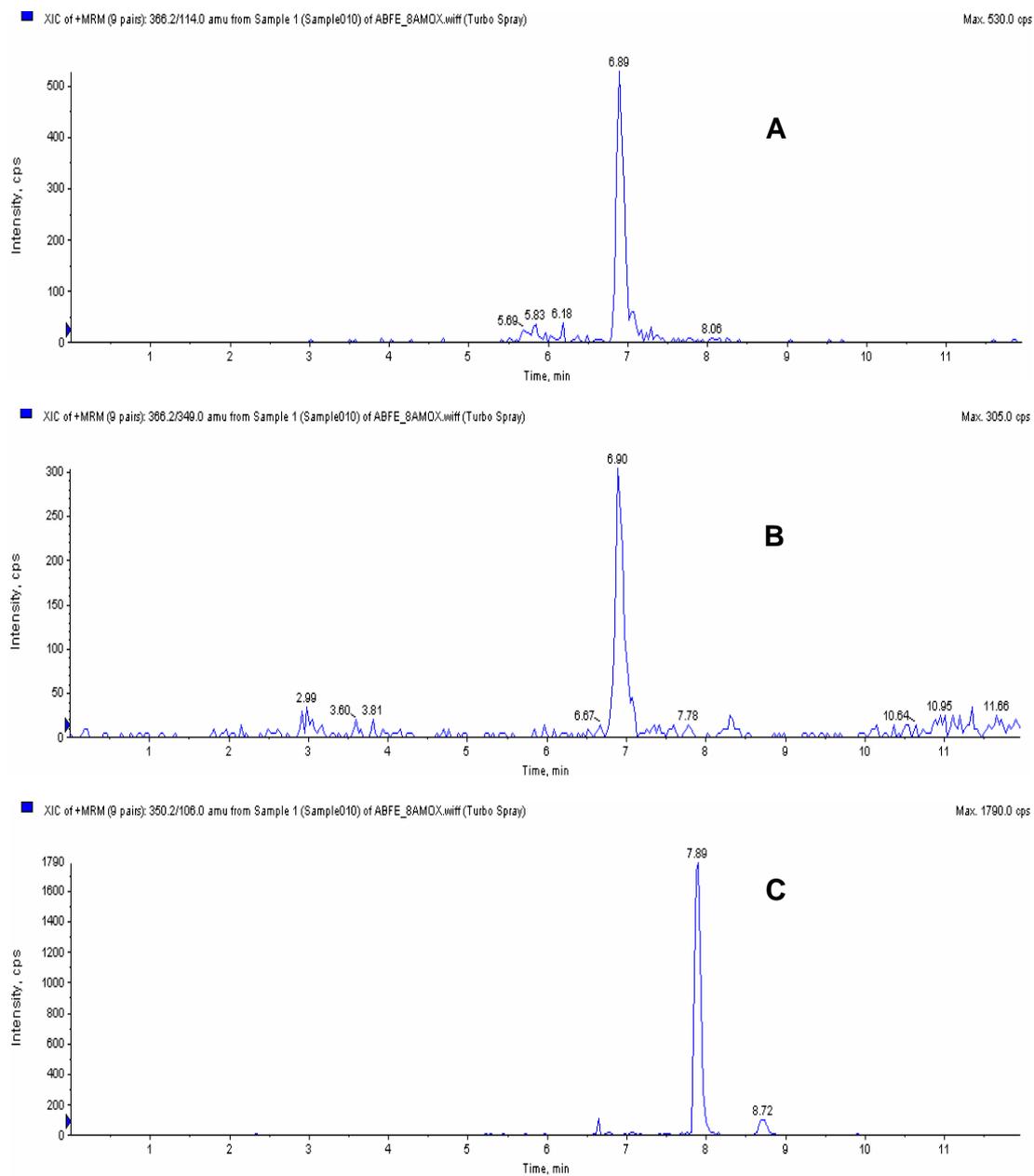


Figura 32: Cromatogramas das transições monitorizadas para a amoxicilina (A corresponde a m/z 366>114 e B a m/z 366>349) e ampicilina (C corresponde a m/z 350>106) ao nível de LQ – 8 µg/kg.

5. Conclusões

O método desenvolvido para a detecção, identificação e quantificação da amoxicilina em tecidos edíveis de várias espécies animais evidenciou cumprir os critérios estabelecidos na Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002^[4], tendo em conta os dados obtidos na validação do método, demonstrando o desempenho adequado a ser implementado em Laboratórios de rotina para a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal.

Pela validação efectuada, foi possível verificar que o método possibilita a obtenção de resultados reprodutíveis (10,2%) e repetíveis (9,2%) estando estes parâmetros dentro dos limites aceitáveis definidos na directiva comunitária^[4]. De igual forma a recuperação do método (94,7%) encontra-se dentro do intervalo aceitável^[4].

Para além destes parâmetros foram também calculados os LD e LQ do método para a amoxicilina que resultaram, respectivamente, em 5 µg/kg e 8 µg/kg. Apesar de ser possível quantificar o composto a concentrações mais baixas apenas se poderá declarar uma amostra não conforme acima do CC α estabelecido – 56 µg/kg e confirmá-la com 95% de certeza a partir de CC β – 67 µg/kg.

A metodologia analítica desenvolvida introduz a utilização de colunas OASIS[®] HLB, que evidenciaram, quando comparadas com colunas de C18, melhores condições de utilização e obtenção de extractos mais limpos com ganhos na recuperação.

Igualmente as condições cromatográficas em fase líquida utilizadas evidenciaram uma boa separação da amoxicilina e do padrão interno, a ampicilina, com picos cromatográficos simétricos, que garantem uma boa avaliação quantitativa. São também adequadas para a detecção dos principais compostos de degradação da amoxicilina, nomeadamente o ácido amoxicilóico e a amoxicilina dicetopiperazina.

A detecção por espectrometria de massa sequencial por triplo quadrupolo, ionização à pressão atmosférica do tipo electrospray assistida por nebulização no modo positivo (ESI⁺) e a utilização da monitorização de reacções múltiplas (MRM) para aquisição de dados, revelou ser adequada em termos de sensibilidade e especificidade, garantindo, também, uma boa avaliação quantitativa dos analitos. No entanto, e tendo em conta a qualidade do extracto obtido pela aplicação do processo extractivo utilizado, parece ser possível a aplicação de detector de massa de filtro de massa simples, o que se traduz num aumento do leque de Laboratórios onde este método pode ser introduzido, por se tratar de equipamento de menor custo de aquisição.

O estudo da estabilidade da amoxicilina resultou na identificação de produtos de degradação, ácido amoxicilóico e amoxicilina dicetipiperazina, resultantes da exposição do composto a

condições agressivas de temperatura e pH. Ficou comprovado que, a temperaturas elevadas e a pH alcalino a degradação da amoxicilina é praticamente total e que, apesar de se formarem os produtos atrás referidos, estes também são sensíveis a estas condições.

Estes resultados aconselham a que as amostras sejam transportadas para o Laboratório, a baixas temperaturas, o mais rapidamente possível. Igualmente, e no Laboratório, estas amostras devem ser mantidas congeladas até serem analisadas.

De acordo com os resultados obtidos parece possível a introdução e validação de outras penicilinas igualmente utilizadas em medicina veterinária para que a presente metodologia possa ser utilizada em multi-deteção.

Fica também em aberto a possibilidade de se adicionar ao método os produtos de degradação estudados ao longo deste trabalho. Bastará, para tanto, otimizar o processo extractivo.

Por determinar fica também o cálculo das incertezas, cuja aproximação ao melhor modelo se encontra ainda em discussão.

6. Bibliografia

1. Directiva 96/22/CE do Conselho, 29 de Abril de 2006, Jornal Oficial das Comunidades Europeias.
2. Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, 8 de Abril de 2006.
3. Directiva 96/23/CE do Conselho, 29 de Abril de 2006, Jornal Oficial das Comunidades Europeias.
4. Decisão da Comissão 2002/657/CE, L.221/8 de 17 de Agosto de 2002.
5. Goodman & Gilman, *As bases farmacológicas da terapêutica*; McGraw-Hill, 2003, Rio de Janeiro.
6. Miller, E.L.; *The Penicillins: a review and update*; Journal of Midwifery & Women's Health, vol. 47, 6, Novembro de 2002.
7. Kemper, N; *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*; Ecological Indicators, 8, 1-13, 2008
8. Alves, R.R., Ferreira, M.B. e outros; *Anafilaxia – Caso Clínico*; Revista. Port. de Imunoalergologia, 13, 3, 259-264, 2005, Lisboa.
9. Reig, M., Toldrá, F.; *Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat*; Food Anal. Methods, 1, 2-9, 2008
10. Stolker, A.A.M., Brinkman, U.A.Th.; *Analytical Strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food producing animals – a review*; Journal of Chromatography A, 1067, 15-51, 2005
11. Wassenaar, T.M.; *Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and implications for Human Health*; Critical Reviews in Microbiology, 31, 155-169, 2005
12. Ligon, B.L; Sir Howard Walter Florey – *The force behind the development of Penicillin*; Seminars in Pediatric Infections Diseases, 15, 2, 109-114, 2004
13. Ligon, B.L ; *Penicillin: Its discovery and early development*, Seminars in Pediatric Infections Diseases, 15, 1, 52-57, 2004
14. Rolinson, G.N., Geddes, A.M.; *The 50th anniversary of the discovery of 6-APA*; International Journal of Antimicrobial Agents, 29, 3-8, 2007
15. Ribeiro, M.P.A., Pádua, T.F. e outros; *Multivariate calibration methods applied to the monitoring of the enzymatic synthesis of ampicillin*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 90, 169-177, 2008
16. Chow, Y., Wu, J., Li, R; *Influence of 6-aminopenicillanic acid on amoxicillin synthesis and p-hidroxyphenylglycine methyl ester hydrolysis*, Biocatalysis and Biotransformation, 23,5, 347-351, 2005
17. Sousa, J.C. de; *Manual de Antibióticos Antibacterianos*; Fundação Fernando Pessoa, edições Fernando Pessoa, Lisboa.
18. Geddes, A.M., Klugman, K.P., Rolinson, G.N.; *Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate*, International Journal of Antimicrobial Agents, 30S, S109-S112, 2007
19. Reyns, T, De Baere, S. et al; *Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, Journal off Mass Spectrometry, 41, 1414-1420, 2006
20. Reyns, T, De Baere, S. et al; *Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography- tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues*, Journal of Chromatography B, 2008

21. De Baere, S., Cherlet, M. et al; *Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Anal. Chem, 74, 1393-1401, 2002
22. Nagele, E., Moritz, R.; *Structure elucidation of degradation products of antibiotic drug amoxicillin, Part I: Examination of the degraded drug products by fragmentation with ion trap MSⁿ*, Agilent Technologies, 2005.
23. Nagele, E., Moritz, R.; *Structure elucidation of degradation products of antibiotic drug amoxicillin, Part II: Identification and confirmation by accurate mass measurement with ESI TOF of the compound ions and the fragments after CID*, Agilent Technologies, 2005.
24. Valvo, L., Ciranni, E. et al; *Development of a simple liquid chromatography method with UV and mass spectrometric detection for the separation of substances related to amoxicillin sodium*, Journal of Chromatography A, 797, 311-316, 1998
25. Nagele, E., Moritz, R.; *Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSⁿ and accurate mass determination by ESI TOF*, American Society of Mass Spectrometry, 16, 1670-1676, 2005
26. Reynolds, J.E.F.; *Martindale – The Extra Pharmacopeia*, 29^a ed., The pharmaceutical press, 1989
27. *Martindale – The complete drug reference*, 32^aed., The pharmaceutical press, 1999
28. Booth, N.H., McDonald, L.E.; *Farmacologia y Terapeutica veterinaria*, vol. II, editorial Acribia, S.A., 1987, Zaragoza.
29. De Baere, S., De Backer, P.; *Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*, Analytical Chimica Acta, 586, 319-325, 2007
30. Popelka, P., Nagy, J. et al; *Comparison of various assays used for detection of beta-lactam antibiotics in poultry meat*, Food Additives and Contaminants, 22,6, 557-562, 2005
31. www.appliedbiosystems.com, Setembro de 2008
32. Wibawa, J.I.D., Fowkes, D. et al; *Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection*, Journal of Chromatography B, 774, 141-148, 2002
33. Ang, C.Y.W., Liu, F.F. et al; *Liquid chromatography analysis of incurred amoxicillin residues in catfish muscle following oral administration of the drug*, J.. Agric. Food Chem., 48, 1673-1677, 2000
34. Bruggink, A, Roos, E.C., Vroom, E; *Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics*, Org. Proc. Res. Dev, 2, 128-133, 1998
35. *Guia da Relacre 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química*; Relacre, edição de Fevereiro de 2000
36. Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D., Sanders, P.; *Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentration according to ISO standard 11843: application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC*, Accred. Qual. Assur, 11, 5862, 2006
37. www.ionsource.com, Setembro de 2008
38. Kennedy, D.G., McCracken, R.J., Cannavan, A., Hewitt, S.A.; *Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk*, Journal of chromatography A, 812, 77-98, 1998
39. Heller, D.N., Smith, M.L., Chiese, O.A.; *LC-MS/MS measurement of penicillin G in bovine plasma, urine, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals*, Journal of Chromatography B, 830, 91-00, 2006

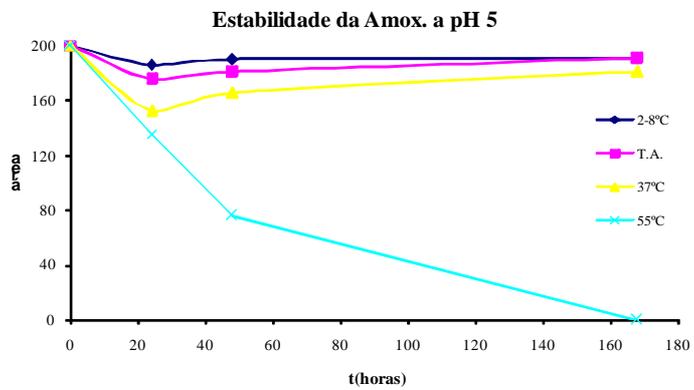
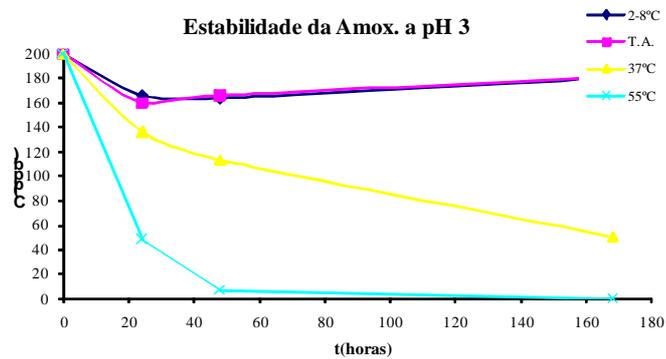
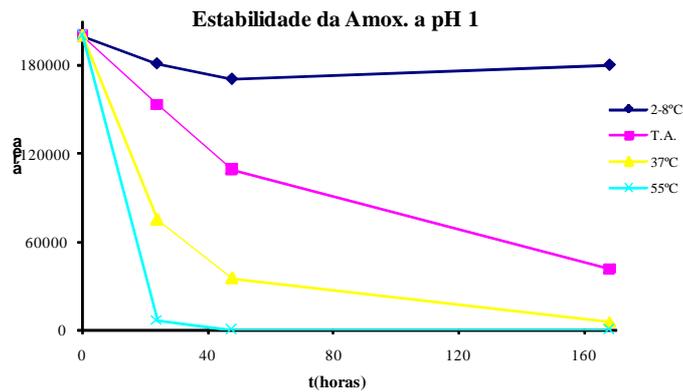
40. García-Reriz, A., Damiani, P.C., Olivieri, A.C., *Different strategies for the direct determination of amoxicillin in human urine by second-order multivariate analysis of kinetic-spectrophotometric data*, Talanta, 71, 806-815, 2007
41. Antignac, J.P., Wasch, K. et al; *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residues analysis*, Analytical Chimica Acta 529, 129-136, 2005
42. Jessome, L.L., Volmer, D.A., *Ion suppression: a major concern in Mass Spectrometry*, LCGC North America, 25, issue 5, 2005
43. Ponte, C., Gracia, M. et al; *Urinary concentrations and bactericidal activity against amoxicillin-nonsusceptible strains of Escherichia coli with single-dose, oral, sustained-release amoxicillin-clavulanic acid: A phase I, open label, noncomparative clinical trial in healthy volunteers*, Clinical Therapeutics, 27, 7, 1043-1049, 2005
44. Anadón, A., Martínez-Larranaga, M.R. et al; *Pharmacokinetics of amoxicillin in broiler chickens*, Avian Pathology, 25, 449-458, 1996
45. Bogialli, S., Capitolino, V. et al; *Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk*, J. Agric. Food Chem, 52, 3286-3291, 2004
46. De Baere, S., Wassink, P. et al; *Quantitative liquid chromatography-mass spectrometric analysis of amoxicillin in broiler edible tissues*, Analytica Chimica Acta, 529, 221-227, 2005
47. Hernandez, E., Rey, R. et al; *Pharmacokinetics and residues of a new oral amoxicillin formulation in piglets: preliminary study*, The Veterinary Journal, 170, 237-242, 2005
48. Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E. et al; *Stability evaluation of amoxicillin in a solid premix veterinary formulation by monitoring the degradation products through a new HPLC analytical method*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 42, 192-199, 2006
49. Pasqualoto, K.F.M., Teófilo, R.F. et al, *A study of physicochemical and biopharmaceutical properties of amoxicillin tablets using full factorial design and PCA biplot*, Analytica Chimica Acta, 595, 216-220, 2007
50. Grujic, S., Vasiljevic, T, Lausevic, M., Ast, T.; *Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry*, Rapid communications in mass spectrometry, 22, 67-74, 2008
51. Granelli, K., Branzell, C.; *Rapid multi-residue screening of antibiotic in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 586, 289-295
52. Heller, D.N., Smith, M.L., Chiese, O.A.; *Detection of penicillin residues in bovine oral fluid (saliva) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid communications in mass spectrometry, 20, 321-324, 2006
53. Gonçalves, L. R. B., Giordano, R. L. C., Giordano, R. C.; *Mathematical modeling of batch and semibatch reactors for the enzymic synthesis of amoxicillin*, Process Biochemistry 40, 247-256, 2005
54. Page, C., et al; *Farmacologia Integrada*, 2ªedição, 2004
55. ISSO 8466-1, *Water quality – calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*, 1990.
56. Silva, P.; *Farmacologia*, 6ªedição, edições Guanabara, 2002
57. Becker, M., Zittlau, E., Petz, M.; *Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid-chromatography – tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 520, 19–32, 2004
58. Ito, Y., Goto, T. et al; *Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis VI. Determination of six penicillins in bovine tissues by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1042, 107–111, 2004

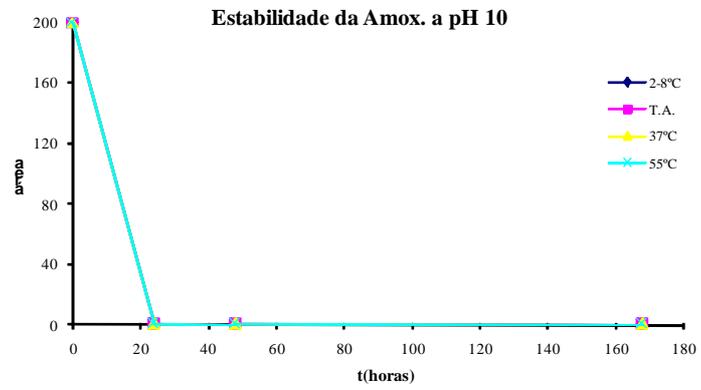
59. Fagerquist, C. K., Lightfield, A. R.; *Confirmatory analysis of b-lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionisation selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry*, Rapid Communications in mass spectrometry, 17, 660-671, 2003
60. Verdon, E., Fuselier, R. et al; *Stability of penicillin antibiotic residues in meat during storage Ampicillin*, Journal of Chromatography A, 882, 135–143, 2000
61. Ito, Y., Goto, T. et al; *High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition*, Journal of Chromatography A, 1100, 193–199, 2005
62. *Training course on multi-antimicrobial screening by LC-MS/MS*, CRL – AFSSA, Fougères, Outubro de 2007.
63. Brock, W. H.; *The Norton History of Chemistry*, Norton, 1993
64. Solomons, T. W. G.; *Organic Chemistry*, 6th edição, Wiley, 1996
65. Garrett, J., Osswald, W., Guimarães, S.; *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*, 3^a edição, Porto editora, 1997, Porto.
66. Spinosa, H. S., Górniak, S. L., Bernardi, M. M.; *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*, 3^a edição, ABPDEA, 2002
67. Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H.; *Simultaneous solid-phase extraction of acidic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1023, 183-195, 2004
68. Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F.; *New hydrophilic materials for solid-phase extraction; Trends in Analytical Chemistry*, 24, nº5, 2005

7. Anexos

A – Estudo de estabilidade da amoxicilina

As figuras seguintes apresentam as variações provocadas por alteração de pH e temperatura na amoxicilina.





B – Teste de Homogeneidade das variâncias

Aceitação da gama de trabalho^[35,55]

Para a determinação da aceitabilidade da gama trabalho utilizando o teste de homogeneidade das variâncias é necessário ter no mínimo 5 determinações de cada um dos pontos extremos da curva de calibração. Seja **1** o ponto mais baixo da curva e **2** o ponto de concentração mais elevada. Para cada um destes pontos calcula-se a variância dada pela seguinte equação:

$$S_1^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-1} \quad S_2^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-1}$$

em que y_i é a leitura referente à concentração x_i e:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_{i,j}}{n_i}$$

As variâncias são testadas para verificar se existem diferenças significativas entre elas calculando o valor teste PG que posteriormente é comparado com o valor tabelado F da distribuição F de Snedecor/Fisher.

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{quando } S_1^2 \geq S_2^2$$

$$PG = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{quando } S_2^2 \geq S_1^2$$

Se $PG \leq F$, então as diferenças entre as variâncias não são significativas e a gama de trabalho é aceite.

Se $PG \geq F$, então as diferenças entre as variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até as variâncias entre o ponto mais baixo e o mais elevado permitirem que $PG \leq F$.

No caso do estudo da gama de trabalho utilizada na validação deste método, os valores obtidos estão apresentados na seguinte tabela:

Tabela 20: Valores de intensidades relativas obtidos para 10 leituras nas concentrações extremas da curva.

	Níveis de concentração (µg/kg)				
	25	50	75	100	250
Y1	0.1114				1.0011
Y2	0.0736				1.0834
Y3	0.0918				1.0190
Y4	0.1239				1.1103
Y5	0.1258				1.1060
Y6	0.1077				1.0738
Y7	0.0959				1.0415
Y8	0.0915				1.0092
Y9	0.1079				1.0078
Y10	0.1494				1.0435
S²	0.0005				0.0017

Como $S_{250}^2 \geq S_{25}^2$, então $PG = \frac{0.0017}{0.005} = 3.6972 < 5.3511 = F(0.01, 9, 9)$

O valor obtido é inferior ao F tabelado para 10 graus de liberdade e com 99% de confiança, logo, a gama de trabalho é aceite.

C – Avaliação da Linearidade

Na avaliação da curva de calibração^[35,55] quanto à linearidade há a calcular o desvio padrão residual da curva de regressão linear, S_{y1} , e o desvio padrão residual do ajuste polinomial, S_{y2} .

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N - 2}} \quad S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N - 3}}$$

Os valores de y são valores esperados, calculados a partir das rectas de calibração. A diferença entre as variâncias associadas aos dois ajustes, DS^2 , é calculada pela seguinte fórmula:

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y1}^2 - (N - 3) \cdot S_{y2}^2$$

Em que N é o número de pontos de calibração. Calcula-se o valor teste PG a partir de DS^2 e de S_{y2} e submete-se o valor obtido a comparação com o valor F da distribuição F de Snedecor/Fisher.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}}$$

Se $PG \leq F$, a função de calibração é linear.

Se $PG \geq F$, a função de calibração não é linear. Neste caso a gama de trabalho deve ser reduzida até se conseguir um ajuste linear.

O estudo da linearidade da curva foi efectuado para as 3 curvas verificando-se a aceitação do ajuste linear para todas.

D – Folha de cálculo – critérios de aceitação dos resultados

Para verificar a aceitação de resultados, de acordo com os critérios estabelecidos na Decisão da Comissão 2002/657/CE[49] e estabelecidos no laboratório, foi construída a folha de cálculo apresentada seguidamente.

Data da análise	Musculo	Directorio
Matriz	Amoxicilina	Data
Analito	Amoxicilina	
Padrão Interno	Ampicilina	

Testes Iniciais

Padrao	RT Amoxicilina	Area A	Area B	razao dos ioes
MPD 50 ug/kg				

Razao S/N	S/N A	Critério	Resultado
Verificacao		S/N>6	

Amostras controlo

(ug/kg)	RT Amoxicilina	Area A	Area B	RT Ampicilina	Area IS
0,0					
25,0					
50,0					
75,0					
100,0					
250,0					

TR relativo	Factor de resposta	desvio TR rel. %	razao ionica	desvio razao ionica %

	Simbolo	Valor
declive	a1	
interseccao em y	b1	
factor correlacao	r1	

(ug/kg)	RT Amoxicilina	Area A	Area B	RT Ampicilina	Area IS
0,0					
25,0					
50,0					
75,0					
100,0					
250,0					

TR relativo	Factor de resposta	desvio TR rel. %	razao ionica	desvio razao ionica %

	Simbolo	Valor
declive	a2	
interseccao em y	b2	
factor correlacao	r2	

(a1-a2)/a1*100%

--

media TR rel.	
dsvp TR rel.	
CV % TR rel.	

media razao ionica	
dsvp razao ionica	
CV % razao ionica	

	Simbolo	Valor
declive	a	
interseccao em y	b	
factor correlacao	r	

Media da area IS=

--

Especificacao	Obtido	Critério	Conformidade
Sensibilidade		=<25%	
Linearidade		=>0,990	
Coefficiente de variacao		<16%	
S/N ABF c/ 50 ug/kg		S/N>6	
Tolerancia max. razao ionica (25-250 ug/kg)		=<	
Tolerancia max. TR rel. (25-250 ug/kg)		=< 2,50%	

AMOSTRAS

Tolerancia maxima de acordo com o criterio da UE=

--

Amostra numero	TR	Area A	Area B	RT Ampicilina	Area IS

TR rel.	factor de resposta	razao ionica	desvio razao ionica%	desvio TR rel%	valor ug/kg	Confirmacao resultado