UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e aplicação de um novo método de extração de
resíduos de antibióticos presentes em carne de frango**

Vinicius Adriano Coelho

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e aplicação de um novo método de extração de
resíduos de antibióticos presentes em carne de frango**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Orientado: Vinicius Adriano Coelho

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Coelho, Vinicius Adriano

Desenvolvimento e aplicação de um novo método de extração de resíduos de antibióticos presentes em carne de frango. Ribeirão Preto, 2014.

72p.:il; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Barbosa Júnior, Fernando

1.Antibióticos Ionóforos 2.Resíduos 3.Frango 4.LC-ESI-MS/MS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Adriano Coelho

Desenvolvimento e aplicação de um novo método de extração de
resíduos de antibióticos presentes em carne de frango

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

A minha família, por ter me ensinado a conquistar meus objetivos por meio de muito trabalho e ser humilde ao conquistá-los.

*I feel no shame
I'm proud of where I came from
I was born and raised in the boondocks
One thing I know
No matter where I go
I keep my heart and soul
In the boondocks
It's where I learned about livin'
It's where I learned about love
It's where I learned about working hard,
And having a little was just enough
It's where I learned about Jesus
And knowin' where I stand
You can take it or leave it
This is me
This is who I am*

Boondocks - Little Big Town

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, renovando minha fé e dando forças para seguir em frente.

Aos meus pais Roberto e Ana Coelho pelo amor e por me darem suporte emocional para a realização dos meus objetivos pessoais e profissionais. Muito obrigado por tudo.

A minha irmã Vanessa e ao meu cunhado Reginaldo pelas conversas, conselhos e apoio nos momentos de decisão e, também, pelos momentos de alegria e diversão.

Ao meu orientador Prof. Fernando Barbosa Júnior pela oportunidade concedida em trabalhar em seu laboratório.

A Vania Braghini de Rezende e Ana Paula Poles pela amizade e por acreditarem em minhas ideias e ajudarem a torna-las realidade.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Eloísa de Paula, Ailton Júnior, Juliana Souza, Maria Fernanda Carneiro, Renan Varrique, Kátia de Marco, Bruno Lemos, Gustavo Barcelos, Marcia e Samuel. E aos antigos integrantes Rodolfo de Freitas, Letícia Nacano e Denise Grotto.

A Vanessa pelo trabalho realizado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidades de Metais.

As funcionárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Rosemary e Rosana, pela atenção e dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido a esse estudo.

“Tenha coragem de seguir o que seu coração e sua intuição dizem. Eles já sabem o que você realmente deseja. Todo resto é secundário.”

Steve Jobs

RESUMO

COELHO, V. A. **Desenvolvimento e aplicação de um novo método de extração para resíduos de antibióticos presentes na carne de frango**. 2014. 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A avicultura de corte brasileira tem apresentado elevados índices de crescimento. No intuito de garantir uma maior eficiência da produção de aves, medicamentos veterinários são administrados para tratamento e prevenção de doenças. A coccidiose é uma dessas doenças, a qual é causada por várias espécies do protozoário do gênero *Eimeria*. Os poliéteres ionóforos são antibióticos largamente administrados no controle desses microrganismos. No entanto, a administração contínua de doses subterapêuticas dessa classe de fármacos pode acarretar no acúmulo de resíduos nos tecidos dos frangos de corte. No intuito de garantir a segurança dos consumidores, são definidos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) por órgãos internacionais como: *Food and Drug Administration* (FDA), *Commission Regulation*, *Codex Alimentarius*; e nacionais como Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Dessa forma, este estudo teve por objetivo o desenvolvimento, validação e aplicação de um método para determinação em peito de frango de resíduos de Lasalocida (LAS), Monensina (MON), Salinomicina (SAL) e Narasina (NAR) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS). Nigericina (NIG) foi utilizada como padrão interno do método analítico. As amostras foram liofilizadas, trituradas e tamisadas, sendo utilizadas no método amostras com tamanho de partículas entre 125 μm e 250 μm . Os resíduos foram extraídos com metanol e uma alíquota do extrato foi evaporada e reconstituída para análise em LC-ESI-MS/MS no modo positivo de monitoramento de reação selecionada (SRM). A etapa de *clean up* foi realizada por meio de filtração do extrato em membrana de PTFE 0,22 μm . O método apresentou-se linear no intervalo de concentração de 0,0 a 40,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para LAS, de 0,0 a 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para MON, de 0,0 a 200,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para SAL e de 0,0 a 30,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para NAR. Para todos os antibióticos o coeficiente de correlação linear (r) esteve de acordo com as diretrizes para métodos bioanalíticos ($r \geq 0,98$). A repetitividade foi avaliada em três concentrações de fortificação para cada antibiótico ionóforo, sendo realizada em três dias consecutivos. Foi obtida boa reprodutibilidade intralaboratorial, com coeficiente de variação (CV) de 4,5% para NAR (22,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 15,2% para LAS (10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A recuperação ficou acima de 90,0% para todos os antibióticos, sendo de 91,5% para LAS (10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 99,1% para MON (15 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Valores satisfatórios para o limite de decisão ($\text{CC}\alpha$) e capacidade de detecção ($\text{CC}\beta$) foram obtidos, sendo $\text{CC}\alpha$ de 11,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 115,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para MON e SAL, respectivamente, e $\text{CC}\beta$ de 13,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 130,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os mesmos antibióticos. Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) foram determinados a partir de dados da curva de calibração. Todos os antibióticos apresentaram LQ inferior ao seu respectivo LMR. O método foi aplicado em 18 amostras disponíveis comercialmente em Ribeirão Preto, SP. De todas as amostras analisadas apenas uma apresentou resíduo de NAR com concentração acima do seu respectivo LD.

Palavras chave: antibióticos ionóforos, resíduos, frango, LC-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

COELHO, V. A. **Development and application of a new extraction method for antibiotic residues in chicken meat**. 2014. 72f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The Brazilian poultry industry has shown high rates of growth. In order to ensure greater efficiency of poultry production, veterinary drugs are administered for the treatment and prevention of diseases. Coccidiosis is one of those diseases, which is caused by various species of protozoa of the genus *Eimeria*. Polyether ionophore antibiotics are widely administered to control these microorganisms. Continuous administration of subtherapeutic doses of this class of drugs may result in the accumulation of residues at low concentration levels in the tissues of broiler. In order to ensure consumer safety, are set Maximum Residue Limits (MRLs) by international organizations such as Food and Drug Administration (FDA), Commission Regulation (EU), Codex Alimentarius; and national such as Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Thus, this study aimed to develop, validate and apply a simple method for determination of residues of Lasalocid (LAS), Monensin (MON), Salinomycin (SAL) and Narasin (NAR) in chicken meat by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Nigericin (NIG) was used as qualitative internal standard. Samples were lyophilized, powdered and sieved. Particles size between 125 μm and 250 μm were used. Residues were extracted with methanol and aliquots of the extracts were evaporated and reconstituted for injection in the LC-ESI-MS/MS operated in positive selected reaction monitoring (SRM). From the molecular ion were obtained two fragment ions and that of higher relative abundance was used in quantification process. Clean-up step was performed by filtration on 0.22 μm PTFE membrane. In the validation process, this method showed linearity over the concentration range from 0.0 to 40.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for LAS; 0.0 to 20.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON; 0.0 to 200.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for SAL and 0.0 to 30.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for NAR. For all antibiotics the coefficient of linear correlation (r) was in accordance with the guidelines for bioanalytical methods ($r \geq 0.99$). The intra-day precision was evaluated at three spiked concentrations for each ionophore antibiotic and was determined in three consecutive days. Good inter-day precision was obtained, with relative standard deviations from 4.5% for NAR (22.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and 15.2% for LAS (10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). For all antibiotics recovery above 90.0% was obtained, which were 91.5% for LAS (10.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and 99.1% for MON (15.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Satisfactory results of decision limit ($\text{CC}\alpha$) and detection capability ($\text{CC}\beta$) were determined, which were $\text{CC}\alpha$ 11.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 115.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for MON and SAL, respectively; $\text{CC}\beta$ 13.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 130.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the same drugs. The limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) were determined from data of the calibration curve. All the LQs were remarkably below the MLRs for each antibiotic. The method was applied to 18 samples acquired in Ribeirão Preto, SP. Of all analyzed samples only one exhibited traces of NAR with concentration above its respective LD. Thus, the proposed method can be applied in routine analysis on samples of commercial chicken meat.

Keywords: ionophore antibiotics, residues, chicken, LC-ESI-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-1. Estruturas químicas dos antibióticos ionóforos mais administrados na avicultura como aditivos alimentares (Adaptado de VOLMER; LOCK, 1998).....	4
FIGURA 1-2. Estrutura química do complexo formado por SAL (A) e MON (B) com o íon sódio (Adaptado de MIAO; MARCH; METCALFE, 2003 (A) e LOPES et al.; 2001 (B))......	5
FIGURA 3-1. Representação esquemática de dois métodos de extração de resíduos de antibióticos ionóforos presentes em ovos. Método 1: Mortier; Daeseleire; Delahaut (2003), Método 2: Mortier; Daeseleire; Van Peteghem (2005).	19
FIGURA 4-1. Espectro de Massas de LAS: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos	33
FIGURA 4-2. Espectro de Massas de MON: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos	34
FIGURA 4-3. Espectro de Massas de NIG: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos	35
FIGURA 4-4. Espectro de Massas de SAL: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos	36
FIGURA 4-5. Espectro de Massas de NAR: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos	37
FIGURA 4-6. Cromatograma obtido a partir da análise de matriz fortificada com LAS (20 µg kg ⁻¹), MON (10 µg kg ⁻¹), SAL (100 µg kg ⁻¹) e NAR (15 µg kg ⁻¹) na concentração de seus respectivos LMRs e NIG (50 µg kg ⁻¹)......	42
FIGURA 4-7. Recuperação em função do tamanho de partícula.....	45
FIGURA 4-8. Influência do tipo de amostra (fresca e liofilizada) e influência da evaporação do solvente de extração para o processo de extração.....	46
FIGURA 4-9. Avaliação do solvente de extração em termos de recuperação.....	48
FIGURA 4-10. Avaliação do volume do solvente de extração.....	49
FIGURA 4-11. Avaliação do volume de extrato evaporado.	50
FIGURA 4-12. Esquema representativo do preparo de amostra de peito de frango liofilizado para determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR por LC-ESI-MS/MS.....	51
FIGURA 4-13. CCAS, CCMF e CCMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R ²) para LAS no intervalo de concentração de 0,0 a 40,0 µg kg ⁻¹	52
FIGURA 4-14. CCAS, CCMF e CCMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R ²) para MON no intervalo de concentração de 0,0 a 20,0 µg kg ⁻¹	53
FIGURA 4-15. CCAS, CCMF e CCMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R ²) para SAL no intervalo de concentração de 0,0 a 200,0 µg kg ⁻¹	53

FIGURA 4-16. CCAS, CCMF e CCEMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R^2) para NAR no intervalo de concentração de 0,0 a 30,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	54
FIGURA 4-17. Cromatograma de uma amostra isenta de resíduos de antibióticos ionóforos (branco analítico).....	63
FIGURA 4-18. Cromatograma de uma amostra real contendo NIG (padrão interno) na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e resíduo de NAR.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-1. Antibióticos ionóforos autorizados pelo MAPA como aditivos alimentares administrados na ração.....	7
TABELA 1-2. LMRs estabelecidos pelas principais agências internacionais e pelo MAPA.....	8
TABELA 1-3. Métodos descritos para determinação de antibióticos ionóforos.....	13
TABELA 3-1. Soluções “mãe” e concentrações dos antibióticos ionóforos	16
TABELA 4-1. Condições MS/MS	30
TABELA 4-2. Condições da fonte de ionização por eletrospray (ESI).....	30
TABELA 4-3. Condições cromatográficas para determinação de LAS, MON, SAL e NAR	39
TABELA 4-4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) Instrumentais	56
TABELA 4-5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) Experimentais.....	56
TABELA 4-6. CV (%) definidos pelo MAPA para cada faixa de concentração	57
TABELA 4-7. Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) e Recuperação do método de determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR em peito de frango liofilizado....	58
TABELA 4-8. Faixas de Recuperação (%) aceitas pelo MAPA para valores acima e abaixo de 100% a partir de uma determinada concentração	59
TABELA 4-9. Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)	60
TABELA 4-10. Condições cromatográficas e valores encontrados durante estudo de robustez	61
TABELA 4-11. Concentração de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR em amostra reais.	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CC α : limite de decisão

CC β : capacidade de detecção

CCAS: curva de calibração do analito em solução

CCEMBF: curva de calibração do extrato da matriz branca fortificado

CCMBF: curva de calibração da matriz branca fortificada

CV: coeficiente de variação

CID: dissociação induzida por colisão

DP: desvio padrão

ELL: extração líquido-líquido

FAO: *Food and Agriculture Organization of United Nations*

FDA: *Food and Drug Administration*

GC: cromatografia gasosa

JECFA: *Expert Committee on Food Additives*

LAS: lasalocida

LC: cromatografia líquida de alta eficiência

LC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

LC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray

LD: limite de detecção

LANAGROS: Laboratórios Nacionais Agropecuários

LMR: Limite Máximo de Resíduo

LQ: limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS: espectrometria de massas

***m/z*:** razão massa carga

MON: monensina

NAR: narasina

NIG: nigericina

PAMvet: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PIB: Produto Interno Bruto

PNCRC/Animal: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Alimentos de Origem Animal

***r*:** coeficiente de correlação linear

***R*²:** coeficiente de determinação

SESA: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná

SRM: monitoramento de reação selecionada

SPE: extração em fase sólida

***T*:** tamanho

***t_R*:** tempo de retenção

UAE: extração assistida por ultrassom

UBABEF: União Brasileira de Avicultura

UCS: *Union of Concerned Scientists*

UE: União Europeia

USDA: *Agricultural Research Service of United States Department of Agriculture*

UV: ultravioleta

WHO: *World Health Organization*

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Produção brasileira de carne de frango.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Legislação.....</i>	<i>1</i>
1.3 <i>Uso de antibióticos na avicultura de corte</i>	<i>2</i>
1.4 <i>Antibióticos Ionóforos</i>	<i>3</i>
1.5 <i>LMRs dos antibióticos Ionóforos.....</i>	<i>6</i>
1.6 <i>Metodologias analíticas</i>	<i>8</i>
1.7 <i>Métodos para determinação de resíduos de antibióticos ionóforos</i>	<i>10</i>
2 OBJETIVO	14
2.1 <i>Estudo 1:.....</i>	<i>14</i>
2.2 <i>Estudo 2:.....</i>	<i>14</i>
2.3 <i>Estudo 3:.....</i>	<i>14</i>
2.4 <i>Estudo 4:.....</i>	<i>14</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 <i>Material.....</i>	<i>15</i>
3.1.1 <i>Reagentes e Solventes.....</i>	<i>15</i>
3.1.2 <i>Padrões e Soluções padrão.....</i>	<i>15</i>
3.1.3 <i>Equipamentos</i>	<i>16</i>
3.1.4 <i>Amostras</i>	<i>17</i>
3.2 <i>Métodos</i>	<i>17</i>
3.2.1 <i>Desenvolvimento do método analítico para determinação de antibióticos ionóforos por LC-ESI-MS/MS</i>	<i>17</i>
3.2.2 <i>Desenvolvimento do método de extração de resíduos de antibióticos ionóforos em amostras de peito de frango.....</i>	<i>18</i>
3.2.3 <i>Validação do método analítico</i>	<i>22</i>
3.2.4 <i>Aplicação do método</i>	<i>28</i>
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 <i>Otimização das condições LC-ESI-MS/MS para determinação de LAS, MON, SAL e NAR</i>	<i>29</i>

4.1.1	<i>Determinação dos íons moleculares e íons produtos.....</i>	29
4.1.2	<i>Otimização das condições cromatográficas.....</i>	38
4.2	<i>Otimização do método de extração de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR de amostras de peito de frango.....</i>	43
4.2.1	<i>Processamento (pré-preparo) de amostras de peito de frango.....</i>	43
4.2.2	<i>Definição do tamanho de partícula da amostra.....</i>	44
4.2.3	<i>Escolha do tipo de amostra analisada.....</i>	45
4.2.4	<i>Definição do solvente de extração.....</i>	47
4.2.5	<i>Definição do volume do solvente de extração.....</i>	48
4.2.6	<i>Volume do solvente de evaporação.....</i>	49
4.2.7	<i>Método de extração proposto.....</i>	50
4.3	<i>Validação do método analítico desenvolvido para a determinação de resíduos de antibióticos ionóforos em peito de frango liofilizado.....</i>	51
4.3.1	<i>Linearidade.....</i>	52
4.3.2	<i>Seletividade e efeito matriz.....</i>	54
4.3.3	<i>Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</i>	55
4.3.4	<i>Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial).....</i>	57
4.3.5	<i>Recuperação.....</i>	58
4.3.6	<i>Limite de Decisão (CCα) e Capacidade de Detecção (CCβ).....</i>	59
4.3.7	<i>Robustez.....</i>	60
4.4	<i>Aplicação do Método.....</i>	61
5	CONCLUSÃO.....	64
6	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Produção brasileira de carne de frango*

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. Seu produto principal, o frango, conquistou os mais exigentes mercados. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), fatores como percepção de segurança quanto à origem, qualidade, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor e conquistar tanto o mercado interno quanto o externo (MAPA, 2014). Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF), esse ramo emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (UBABEF, 2014).

Em 2012, de acordo com o Relatório Anual 2013 da UBABEF, a produção de carne de frango chegou a 12,645 milhões de toneladas. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Da quantidade total de carne de frango produzida pelo país em 2012, 69% foram destinados ao consumo interno, e 31% para exportações. Com isso, o consumo per capita anual atingiu 45 kg.

A liderança brasileira nas exportações de carne de frango ocorre desde 2004. As principais regiões de destino são Oriente Médio, Ásia, África e União Europeia, abrangendo cerca de 150 países (UBABEF, 2013). Com esse desempenho, a carne de frango brasileira aumentou ainda mais sua presença na mesa dos consumidores nacionais e internacionais.

1.2 *Legislação*

Com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores e garantir a qualidade dos alimentos de origem animal, as autoridades têm estabelecido Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para diversos medicamentos veterinários ou têm realizado a proibição de alguns deles (LOPES et al., 2012 (A), LOPES et al., 2012 (B)). Os EUA, por meio do *Food and Drug Administration* (FDA), e a União Europeia (UE), por meio da *Council Regulation 37/2010/EC* e *European Medicine Agency*, definem os LMRs

vigentes em seus territórios, a fim de reduzir a exposição de sua população aos resíduos, principalmente de antibióticos, presentes em tecidos animais destinados à alimentação (DI CORCIA; NAZZARI, 2002; BLASCO; DI CORCIA; PICÓ, 2009).

No Brasil, por meio da Instrução Normativa DAS nº 42 de 20 de Dezembro de 1999, foi instituído pelo MAPA o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes de Origem Animal (PNCRC/Animal) (MAPA, 2014). Este plano monitora a presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em diversos setores produtivos, dentre eles o de aves (MAPA, 2014). As análises são realizadas pelos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS) e por laboratórios credenciados, cujo corpo técnico busca o desenvolvimento e inovação em metodologia analítica, visando aperfeiçoar o tempo de análise, capacidade e qualidade (MAPA, 2014).

Em 2001, o Ministério da Saúde implantou o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários (PAMvet), no intuito de avaliar e prevenir riscos à saúde dos consumidores. O PAMvet foi desenvolvido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e instituído oficialmente pela Resolução RDC Nº 253, de 16 de setembro de 2003 (ANVISA, 2014). Tal programa, de uma forma geral, visa o conhecimento da dimensão da exposição da população aos resíduos de medicamentos veterinários, visto a importância de tais informações para nortear as ações de controle para a proteção do consumidor.

1.3 Uso de antibióticos na avicultura de corte

O grande consumo de carne de frango exigiu uma demanda maior da produção aviária. Em virtude dessa exigência em grandes proporções, as aves são criadas em escala industrial, em alojamentos que podem abrigar até 50 mil cabeças. Consequentemente, ocorre incidência de alto número de doenças, devido à elevada densidade populacional dos aviários. Para controlar essas enfermidades, é empregado o uso de antibióticos tanto para fins terapêuticos quanto profiláticos.

De acordo com a *Union of Concerned Scientists* (UCS), todos os anos nos EUA são comercializados, aproximadamente, 11 milhões de quilos de antibióticos para a produção animal, sendo quase metade desse número destinado à avicultura (UCS, 2001). Em 1999, na Europa a quantidade destinada para a produção animal foi de

aproximadamente 3,9 milhões de quilos (KOOLS; MOLTSMANN; KNACKER, 2008). Já no Brasil, de forma geral, não existem dados que relatem as quantidades de antibióticos comercializadas para a produção animal (REGITANO; LEAL, 2010). Em 2005, no intuito de obter maiores informações, a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA) realizou no estado um estudo qualitativo sobre a comercialização de medicamentos veterinários para frangos de corte e galinhas poedeiras.

De acordo com o levantamento realizado pela SESA, foi verificado o uso de 126 produtos comerciais, com 49 princípios ativos diferentes destinados à produção de frangos de corte. Dentre as classes de medicamentos preventivos mais citados estão os antibióticos ionóforos, com 20% das citações, sendo o segundo grupo mais citado. Já em relação aos grupos de medicamentos terapêuticos, os ionóforos foram os que receberam o maior número de citações, correspondendo a 25% do total. Trata-se, portanto, de uma classe de antibióticos com grande aplicação na produção de frango de corte tanto para fins profiláticos como terapêuticos.

1.4 Antibióticos Ionóforos

Os antibióticos ionóforos são largamente utilizados como aditivos alimentares na ração para prevenção da coccidiose, uma grave infecção aviária causada por várias espécies de protozoários do gênero *Eimeria* (GALARINI et al., 2011). Na forma aguda da doença, ocorre destruição das células do epitélio intestinal das aves, o que provoca hemorragias intestinais e compromete a absorção de nutrientes. Essa combinação é, geralmente, fatal e um surto de coccidiose pode acarretar grandes prejuízos aos criadores (MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002). Na forma subaguda da coccidiose, um pequeno número de oocistos presentes no epitélio intestinal das aves é capaz de reduzir a conversão alimentar e promover baixo ganho de peso (GALARINI et al., 2011).

Os coccidiostáticos apresentam dois grupos de substâncias ativas: os antibióticos ionóforos naturais, constituídos por lasalocida (LAS), monensina (MON), salinomina (SAL), narasina (NAR) (**FIGURA 1-1**), maduramicina e semduramicina; e os coccidiostáticos químicos, representados por halofuginona, nicarbazina e robenidina (OLEJNIK; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ; JEDZINIAK, 2009). Os fármacos mais empregados na avicultura são LAS, MON, SAL e NAR (SPISSO et al., 2010). Os

ionóforos são poliéteres carboxílicos que apresentam alto peso molecular e são derivados de várias espécies de *Streptomyces* (MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005).

FIGURA 1-1. Estruturas químicas dos antibióticos ionóforos mais administrados na avicultura como aditivos alimentares (Adaptado de VOLMER; LOCK, 1998).

Esses fármacos são capazes de formarem complexos com cátions polares como K^+ , Na^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} (**FIGURA 1-2**) e apresentam lipossolubilidade, o que facilita o transporte de íons através da membrana celular (SASSMAN; LEE, 2007). O transporte de cátions através da membrana é responsável pela atividade farmacológica dos ionóforos. Devido ao transporte de cátions, o equilíbrio químico da célula parasitária é severamente afetado, o que causa a morte do protozoário (MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002; MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2004).

FIGURA 1-2. Estrutura química do complexo formado por SAL (A) e MON (B) com o íon sódio (Adaptado de MIAO; MARCH; METCALFE, 2003 (A) e LOPES et al.; 2001 (B)).

Além da atividade coccidiostática, os ionóforos também atuam como promotores de crescimento, uma vez que aumentam a conversão de alimentos em ganho de peso (SASSMAN; LEE, 2007). Essa aplicação é direcionada a outros animais como bovinos, ovinos e suínos, a fim de melhorar a eficiência alimentar e garantir o aumento da taxa de crescimento (ROKKA; PELTONEN, 2006). Já na produção de frangos de corte, na intensão de controlar e prevenir a coccidiose, os ionóforos são utilizados como aditivos alimentares durante quase todo o período de criação, exceto na retirada pré-abate (NIESSEN, 1998; OLEJNIK; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ; JEDZINIAK, 2009).

Os antibióticos ionóforos podem apresentar alta toxicidade em relação às outras classes de antibióticos, o que é motivo de preocupação quanto ao seu uso (SASSMAN; LEE, 2007). Existem relatos de intoxicação com maduramicina em humanos com ocorrência de insuficiência renal aguda; no Brasil há casos de intoxicação humana com

MON (KOUYOUMDJIAN et al., 2001 apud SPISSO et al., 2010). Estudos de toxicidade mostraram que os órgãos alvo dos ionóforos são os músculos cardíaco, esquelético e nervos periféricos (MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2004). A toxicidade dos ionóforos é extremamente dependente das espécies, por exemplo, doses terapêuticas de LAS para frangos de corte são altamente tóxicas para cavalos (MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005; SASSMAN; LEE, 2007).

De uma forma geral, os antibióticos são os medicamentos veterinários mais empregados como aditivos alimentares em ração para aves, devido ao seu uso na prevenção e tratamento de doenças (BLASCO; DI CORCIA; PICÓ, 2009). Esses compostos podem se acumular nos tecidos das aves, o que representa riscos à saúde humana devido à exposição direta aos seus resíduos (REGITANO; LEAL, 2010). A exposição a baixas doses desses compostos por um longo período de tempo pode resultar na seleção de bactérias entéricas mais resistentes, que por sua vez, são capazes de transferir essa resistência para bactérias patogênicas, o que pode vir a se tornar um problema de saúde pública (SESA, 2005; WALLMANN, 2006; MARTINEZ, 2009).

1.5 LMRs dos antibióticos Ionóforos

Os antibióticos ionóforos são os agentes anticoccidianos mais empregados, devido à eficiência na prevenção da coccidiose (MATABUDUL et al., 2001). No Brasil, o MAPA autoriza a utilização desses antibióticos para uso exclusivo em rações, como aditivos alimentares. São administrados na forma molecular ou na forma de sais orgânicos, geralmente, na forma de sais de sódio (**TABELA 1-1**).

Diversos órgãos internacionais definem LMRs para antibióticos ionóforos presentes em ovos e em tecidos de frango, como músculo, pele/gordura, fígado e rim. Dentre as agências reguladoras estão: o FDA (EUA); a *Commission Regulation* e *European Medicine Agency* (UE); o *Codex Alimentarius* e, por fim, o *Join* FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives* (JECFA) (**TABELA 1-2**).

TABELA 1-1. Antibióticos ionóforos autorizados pelo MAPA como aditivos alimentares administrados na ração

<i>Ionóforo</i>	<i>CATEGORIA ANIMAL</i>	<i>TEOR EM PPM ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	<i>PERÍODO DE RETIRADA</i>
LASALOCIDA	Frangos de Corte	75 a 125	5 dias antes do abate
MONENSINA SÓDICA	Frangos de Corte e	100 a 120	3 dias antes do abate
	Frangas de Reposição		
NARASINA	Frangos de Corte	60 a 80	5 dias antes do abate
SALINOMICINA SÓDICA	Frangos de Corte e	44 a 66	5 dias antes do abate
	Frangas de Reposição		

O *Codex Alimentarius* é uma comissão criada pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO) que desenvolve normas harmonizadas a nível internacional de alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2014); enquanto a JECFA é um comitê internacional de especialistas científicos, administrado conjuntamente pela FAO e pela WHO (JECFA, 2014).

O MAPA, por meio da Instrução Normativa SDA Nº 17, de 29 de Maio de 2013, definiu o escopo analítico, LMRs e a amostragem a serem executados pelo PNCRC/Animal no referido ano. Para a carne de frango, os LMRs dos antibióticos ionóforos foram estabelecidos nas seguintes concentrações: LAS 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$; MON 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$; NAR 15,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e SAL 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. De uma forma geral, para a carne de frango o MAPA estabelece para os antibióticos ionóforos valores de LMRs iguais aos estabelecidos pelas principais agências internacionais, com exceção da SAL a qual apresenta LMR somente definido pelo MAPA (TABELA 1-2).

A ANVISA, por meio da RDC Nº 53, de 02 de outubro de 2012, firma os LMRs de medicamentos de uso veterinário em alimentos de origem animal a serem monitorados pelo PAMvet. A Resolução tem por base o Regulamento Técnico definido pelos países que compõem o MERCOSUL (Resolução GMC MERCOSUL Nº 54/00) e busca eliminar os obstáculos que geram as diferenças nacionais existentes nesses produtos (ANVISA, 2014). No caso dos antibióticos ionóforos, não há LMRs

estabelecidos por esta Resolução, permanecendo como referências aqui no Brasil aqueles estabelecidos pelo MAPA.

TABELA 1-2. LMRs estabelecidos pelas principais agências internacionais e pelo MAPA

Limites Máximos de Resíduos (LMRs) em Frango						
IONÓFOROS	Tecidos	FDA	LMRs UE	Codex Alimentarius	JECFA- FAO	MAPA
LAS	<i>Músculo</i>	-	20 µg kg ⁻¹ *	-	-	20 µg kg ⁻¹
	<i>Pele + Gordura</i>	1,2 µg g ⁻¹	100 µg kg ⁻¹ *	-	-	-
	<i>Fígado</i>	0,4 µg g ⁻¹	100 µg kg ⁻¹ *	-	-	-
	<i>Rim</i>	-	50 µg kg ⁻¹ *	-	-	-
	<i>Ovos</i>	-	150 µg kg ⁻¹ *	-	-	10 µg kg ⁻¹
MON	<i>Músculo</i>	-	8 µg kg ⁻¹ **	10 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹
	<i>Pele + Gordura</i>	-	25 µg kg ⁻¹ **	100 µg kg ⁻¹	100 µg kg ⁻¹	-
	<i>Fígado</i>	-	8 µg kg ⁻¹ **	10 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	-
	<i>Rim</i>	-	8 µg kg ⁻¹ **	10 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	-
	<i>Ovos</i>	-	-	-	-	10 µg kg ⁻¹
NAR	<i>Músculo</i>	-	50 µg kg ⁻¹ **	15 µg kg ⁻¹	15 µg kg ⁻¹	15 µg kg ⁻¹
	<i>Pele + Gordura</i>	-	50 µg kg ⁻¹ **	50 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	-
	<i>Fígado</i>	-	50 µg kg ⁻¹ **	50 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	-
	<i>Rim</i>	-	50 µg kg ⁻¹ **	15 µg kg ⁻¹	15 µg kg ⁻¹	-
	<i>Ovos</i>	-	-	-	-	10 µg kg ⁻¹
SAL	<i>Músculo</i>	-	-	-	-	100 µg kg ⁻¹
	<i>Pele + Gordura</i>	-	-	-	-	-
	<i>Fígado</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rim</i>	-	-	-	-	-
	<i>Ovos</i>	-	-	-	-	10 µg kg ⁻¹

*LMRs definidos pela *Commission Regulation* (UE)

**LMRs definidos pela *European Medicine Agency* (UE)

1.6 Metodologias analíticas

Diante da necessidade dos órgãos regulamentadores em estabelecer LMRs, é preciso o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e específicos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (LOPES et al., 2011). Apesar do alto poder de resolução, a cromatografia gasosa (gas

chromatography, GC) não é a técnica mais utilizada, pois a maioria dos antibióticos é muito polar e/ou termicamente instável e apresentam peso molecular elevado que dificulta a volatilização (DI CORCIA; NAZZARI, 2002; GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; KAUFMANN et al., 2008; CARRETERO; BLASCO; PICÓ, 2008). Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC ou LC) é a técnica de escolha para determinação de resíduos de antibióticos (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005).

A LC, com a utilização de detectores convencionais, é por si só uma metodologia de quantificação adequada e confiável, desde que o método de análise tenha sido validado. No entanto, para determinadas classes de antibióticos, a LC quando acoplada à detecção convencional, como ultravioleta (UV) e fluorescência, não é capaz de identificar fármacos de determinadas classes químicas.

A principal dificuldade refere-se à ausência de cromóforos para detecção por UV ou fluorescência, sendo necessárias etapas de derivatização para que a detecção seja realizada. Porém, para análises de rotina a derivatização torna o método mais longo e laborioso. A partir do acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas (*liquid chromatography - mass spectrometry*, LC-MS) foi possível solucionar esse problema enfrentado quando os compostos em determinação não apresentam cromóforos.

A LC acoplada à MS sequencial (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) é uma técnica muito seletiva, pois as fragmentações características e a razão massa carga (m/z) dos íons produtos de uma determinada molécula garantem as informações necessárias para sua efetiva identificação. Assim, a determinação de compostos que não poderiam ser detectados por técnicas convencionais, em que a identificação se baseia apenas no tempo de retenção, pode ser realizada (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005).

Com base nestas informações, a UE utiliza a MS para a identificação e confirmação de resíduos químicos em alimentos. Por meio da *European Commission* (EC) *Decision* 2002/657/CE, afirma que métodos baseados apenas na análise cromatográfica, sem o uso da MS, não são adequados como métodos de confirmação (DI CORCIA; NAZZARI, 2002; KAUFMANN et al., 2008; CARRETERO; BLASCO; PICÓ, 2008).

A escolha da fonte de ionização do espectrômetro de massas é um fator importante a ser levado em consideração. A ionização por eletrospray (*electrospray ionization*, ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) são as técnicas mais utilizadas para análise de amostras de alimentos por LC-MS/MS para determinação de resíduos de antibióticos (DI CORCIA; NAZZARI, 2002; NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005). ESI é recomendada para compostos polares e de massa molecular considerável, características as quais se enquadra para a maioria dos antibióticos. Dessa forma, a ESI é a mais empregada na determinação de antibióticos (NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005).

O modo de aquisição de espectros também é um fator relevante. Por meio da aquisição de espectros pelo monitoramento de reação selecionada (*selected reaction monitoring*, SRM), um ou mais íons produtos são originados a partir de íons precursores selecionados em um estágio prévio de MS (VESSECCHI et al., 2011). Com a utilização de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com ESI e aquisição de espectros por SRM, é possível selecionar um íon molecular no primeiro quadrupolo (Q_1), fragmentá-lo no segundo quadrupolo ou cela de colisão (q_2) por meio de energia de fragmentação específica e selecionar os íons filhos ou fragmentos no terceiro quadrupolo (Q_3).

Assim, a LC-ESI-MS/MS com modo de aquisição de espectros por SRM é a técnica mais empregada na determinação de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal. Essa técnica fornece a seletividade adequada para a identificação confirmatória de um composto por meio de seu íon molecular e íons produtos (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005).

1.7 Métodos para determinação de resíduos de antibióticos ionóforos

Muitos métodos analíticos para determinação de antibióticos ionóforos têm sido relatados desde a década de 70 (ASSUKABE et al., 1993). Estes compostos, com exceção da LAS, não apresentam cromóforos adequados para detecção por UV ou fluorescência, sendo necessárias reações de derivatização (GALARINI et al., 2011). Um dos primeiros métodos cromatográficos desenvolvido propunha a determinação de SAL por LC, utilizando derivatização pós-coluna com vanilina (ASSUKABE et al., 1993; ASSUKABE et al., 1994).

A partir desse trabalho, muitos métodos foram desenvolvidos para determinação dos antibióticos ionóforos por LC, utilizando as mais diversas reações de derivatização para detecção por fluorescência (ASSUKABE et al., 1993; ASSUKABE et al., 1994; INOUE et al., 2012). No entanto, a LAS, por apresentar menor reatividade com os reagentes de derivatização, dificultava a determinação simultânea com os demais fármacos dessa classe de medicamentos (ASSUKABE et al., 1993). Tal composto possui um cromóforo fluorescente, o que facilita o desenvolvimento de métodos analíticos para sua determinação por meio de LC com detecção por fluorescência (ASSUKABE et al., 1993; ASSUKABE et al., 1994; MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000).

O acoplamento da LC com a MS só recentemente conduziu ao desenvolvimento de métodos analíticos satisfatórios para a determinação de antibióticos ionóforos presentes em alimentos de origem animal (GALARINI et al., 2011). A técnica LC-MS/MS fornece melhor seletividade comparada à LC com detecção convencional como UV e fluorescência. E ainda, o desenvolvimento cromatográfico é realizável, ou seja, a coeluição dos compostos, comum nessa classe de fármacos devido à semelhança de suas estruturas químicas, não representa um entrave ao desenvolvimento do método analítico. Ao monitorar a transição íon molecular e íons produtos por meio do modo SRM, a técnica LC-MS/MS também fornece seletividade suficiente para confirmar e identificar a presença de resíduos (GALARINI et al., 2011).

Para a determinação de antibióticos ionóforos, existe um grande número de métodos analíticos, com a utilização da técnica LC-MS/MS, desenvolvidos para identificação e quantificação de resíduos em diversos tecidos de animais, em leite e ovos (**TABELA 1-3**). No geral, esses métodos fazem uso de solventes orgânicos como metanol e acetonitrila para extração; seguida de agitação, ultrassonicação e, por fim, *clean up* dos extratos.

A extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE) é a técnica de *clean up* mais empregada no processo de extração dos antibióticos ionóforos em tecidos de frango (MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000; MATABUDUL et al., 2001; ROSÉN, 2001; MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002; OLEJNIK; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ; JEDZINIAK, 2009; LOMBARDI et al., 2012; KIM et al., 2012). Na etapa de *clean up* pode ser empregada filtração em membranas de PVDF ou PTFE a fim de reduzir o custo e o tempo de análise. A extração assistida por

ultrassom (*ultrasound-assisted extraction*, UAE), seguida de centrifugação e filtração do extrato, é um dos procedimentos que vem sendo descritos na literatura (MORTIER; DAESELEIRE; DELAHAUT, 2003, MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2004, SPISSO et al., 2010; SPISSO et al., 2010).

De uma forma geral, a UAE é reconhecida como uma técnica de extração eficiente que reduz drasticamente o tempo de análise e aumenta o rendimento; e muitas vezes a qualidade do extrato (PICÓ, 2013). A maioria dos métodos com extração de resíduos de antibióticos ionóforos por UAE descreve a utilização de banho ultrassônico, uma vez que se trata de uma técnica adequada para análise de rotina, pois um grande número de amostras é ultrassonicado ao mesmo tempo (MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2004, SPISSO et al., 2010; SPISSO et al. 2010). Dessa forma, atualmente, priorizam-se métodos de extração que sejam rápidos e práticos, que explorem a sensibilidade do sistema LC-MS/MS.

No entanto, todos os métodos descritos não apresentam nenhuma preocupação em relação ao pré-preparo das amostras de tecidos de frango, ou seja, as amostras são analisadas após técnicas simples de homogeneização. É recomendável que as amostras sejam secas e moídas até se transformarem em pó com tamanho de partículas controlado, a fim de garantir a homogeneidade e a representatividade da massa a ser analisada. Para isso são empregadas técnicas como: liofilização e moagem (NOMURA; SILAL; OLIVEIRA, 2008).

Estas técnicas são muito empregadas no preparo de materiais de referência, visto a importância da homogeneidade e estabilidade no processo de quantificação (JIMÉNEZ; COMPANYÓ; GUITERAS, 2012). Assim, o pré-preparo de amostras garante uma maior extração de resíduos de antibióticos ionóforos presentes em tecido de frango, além de conferir maior confiabilidade nos resultados obtidos. Na **TABELA 1-3** estão apresentados alguns trabalhos que determinaram antibióticos ionóforos em diversas matrizes.

TABELA 1-3. Métodos descritos para determinação de antibióticos ionóforos

Ionóforos	Matriz	Deteção	Coluna	Fase Móvel	Extração	Referência
Lasalocida	Sangue	LC-Fluorescência ($\lambda_{\text{ABS}} = 310 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{EMS}} = 430 \text{ nm}$)	Partisil PXS-5/25	hexano-tetrahidrofurano-metanol-trietilamina-hidróxido de amônio (810:140:20:20:10)	LLE	KAYKATY; WEISS, 1983
Monensina	Carne de frango	LC-Fluorescência ($\lambda_{\text{ABS}} = 310 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{EMS}} = 430 \text{ nm}$) Derivatização: antrildiazometano (ADAM)	Nucleosil C18	metanol-água (95:5 v/v)	LLE	HOSHINO et al.; 1985
Lasalocida, Monensina e Salinomicina	Ração	LC-Fluorescência ($\lambda_{\text{ABS}} = 360 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{EMS}} = 420 \text{ nm}$) Derivatização: 1-bromoacetilpireno (BAP)	Develosil 5 C18	metanol-água (97:3 v/v)	LLE, SPE	ASUKABE et al.; 1994
Lasalocida, Monensina, Salinomicina e Narasina	Tecidos e ovos	LC-MS/MS ESI+ MRM	Luna C18	acetonitrila: metanol: tetrahidrofurano: água: ácido trifluoracético (67:10:10:13:0,1 v/v)	SPE	MATABUDUL et al.; 2001
Lasalocida, Monensina, Salinomicina e Narasina	Ovos	LC-MS/MS ESI+ MRM	Waters Symetry C18	A = acetonitrila: água: ácido fórmico (95: 5: 0,1 v/v), B = acetonitrila: ácido fórmico (100:0,1 v/v) Gradiente	Filtração (PVDF)	MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005
Lasalocida, Monensina, Salinomicina e Narasina	Carne de frango e ovos	LC-MS/MS ESI+ MRM	Luna C18	acetonitrila: acetato de sódio 0,002 M: ácido acético (95: 5: 0,02)	SPE	ROKKA; PELTONEN, 2007
Polieter ionóforos, macrolídeos e lincosamidas	Ovos	LC-MS/MS ESI+ MRM	ACE C18	água: acetonitrila: metanol: ácido fórmico (93: 7: 0: 0,1 v/v) Eluição por gradiente	Filtração (PVDF)	SPISSO et al.; 2010
Coccidiostáticos (lasalocida, monesina, salinomicina e narasina)	Ovos	LC-MS/MS ESI+ MRM	Synergi Fusion C18	A = água, ácido fórmico 0,1% B = acetonitrila, ácido fórmico 0,1%, acetato de sódio 0,02 mM Gradiente	SPE	GALARINI et al.; 2011
Coccidiostáticos (lasalocida, monensina, salinomicina, narasina)	Leite	LC-MS/MS ESI+ MRM	Synergi Polar-RP C18	A = água: ácido fórmico (100: 0,1) B = acetonitrila: ácido fórmico (100: 0,1) Gradiente	ELL, SPE, Filtração (PVDF)	NEBOT et al.; 2012
Lincomicina e narasina	Carne de frango, leite e ovos	LC-MS/MS ESI+ MRM	Capcell Pak C18	A = 10 mM formiato de amônio, 0,1% ácido fórmico em água B = metanol Gradiente	SPE, Filtração	KIM et al.; 2012
Screening (Monensina, Saliomicina, Narasina)	Tecidos, leite, mel e ovos	UPLC-MS/MS ESI+ MRM	Acquity UPLC HSS T3	água: acetonitrila: ácido fórmico (95:5:0,05) Gradiente	LLE	ROBERT et al.; 2013
Screening (Monensina, Saliomicina, Narasina)	Água superficial	LC-MS/MS ESI+ MRM	Synergi Polar-RP C18	Fase Móvel: A = ácido fórmico 0,1% em acetonitrila B = ácido fórmico 0,1% em água Gradiente	SPE	IGLESIAS et al.; 2014

2 OBJETIVO

Desenvolver, validar e aplicar um método analítico empregando a LC-ESI-MS/MS para a determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR presentes em peito de frango. Para atender esse objetivo, os seguintes estudos foram realizados:

2.1 *Estudo 1:*

Desenvolver um método simples, rápido e prático para determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR presentes em peito de frango por LC-ESI-MS/MS.

2.2 *Estudo 2:*

Realizar o pré-preparo de peito de frango por meio de técnicas como liofilização, trituração e tamização. Desenvolver um método de extração com aplicação de uma etapa simples de *clean up*.

2.3 *Estudo 3:*

Validar o método desenvolvido quanto aos parâmetros de linearidade, seletividade, efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), recuperação, limite de decisão, capacidade de detecção e robustez.

2.4 *Estudo 4:*

Aplicar o método validado em amostras disponíveis comercialmente em supermercados de Ribeirão Preto, SP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes e Solventes

Foram utilizados metanol e acetonitrila LiChrosolv[®] para cromatografia líquida, provenientes da Merck Millipore[®] (Darmstadt, Alemanha). Ácido fórmico ASC reagent $\geq 96\%$, adquirido da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA) e água deionizada de alta pureza (resistividade $18,2 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore[®] RiOs-DITM, Bedford, MA, USA).

3.1.2 Padrões e Soluções padrão

Os padrões analíticos dos antibióticos ionóforos LAS, (*Lasalocid A sodium salt solution* $100,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ in acetonitrile, VETRANALTM, analytical standard, Fluka), MON (*Monensin sodium salt hydrate*, VETRANALTM, analytical standard, Fluka), SAL (*Salinomycin monosodium salt hydrate*, VETRANALTM, analytical standard, Fluka), NAR (*Narasin from Streptomyces auriofaciens*, $\geq 98\%$) e nigericina (NIG) - padrão interno - (*Nigericin sodium salt*, $\geq 98\%$), foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Solução padrão estoque de cada um dos antibióticos foi preparada na concentração $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em acetonitrila 80% e armazenada a 4°C .

A partir da solução padrão estoque, eram preparadas soluções nas concentrações de $10.000,0$ e $1.000,0 \text{ ng mL}^{-1}$ em metanol 90% para cada um dos antibióticos, diariamente e sempre que necessário. Por fim, a partir dessas soluções foram preparadas quatro soluções “mãe” em metanol 90%, contendo todos os antibióticos para fortificação das amostras e construção das curvas analíticas. A denominação dessas soluções “mãe” e a concentração correspondente a cada antibiótico são apresentadas na **TABELA 3-1**. Para NIG (padrão interno), foi preparada solução na concentração $500,0 \text{ ng mL}^{-1}$ em metanol 90% a partir da solução $1.000,0 \text{ ng mL}^{-1}$.

TABELA 3-1. Soluções “mãe” e concentrações dos antibióticos ionóforos

Solução Mãe	Lasalocida (ng mL⁻¹)	Monensina (ng mL⁻¹)	Salinomicina (ng mL⁻¹)	Narasina (ng mL⁻¹)
A	20,0	10,0	100,0	15,0
B	40,0	20,0	200,0	30,0
C	60,0	30,0	300,0	45,0
D	80,0	40,0	400,0	60,0

3.1.3 Equipamentos

Durante o desenvolvimento e validação do método analítico e do método de extração foram utilizados equipamentos como balança analítica modelo FA2104N da Bioprecisa (Curitiba, PR, Brasil), agitador vórtex modelo QL-901 da marca Biomixer, banho ultrassônico (frequência ultrassônica 40 kHz, potência ultrassônica 135 W, frequência 50/60 Hz) modelo USC-1400 da Unique® (Indaiatuba, SP, Brasil), centrífuga modelo 80-2B-15ML da marca Centribio e banho de aquecimento modelo SL-150/22 da Solab (Piracicaba, SP, Brasil). Também foi utilizado cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas da Thermo Scientific® (San Jose, CA, EUA).

O cromatógrafo líquido modelo Accela LC *system* é composto por bomba modelo Accela 600 *pump* e amostrador automático modelo Accela *autosampler*. O espectrômetro de massas modelo TSQ Quantum Access Max é composto por analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray. O controle entre cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas é realizado pelo *software* XCalibur (versão 2.0 SP1). Os parâmetros do espectrômetro de massas são controlados pelo *software* TSQ Tune. Foi empregada coluna analítica Brownlee® C18 (5 µm, 100,0 x 4,6 mm) Perkin Elmer® (Norwalk, EUA) conectada a uma pré-coluna Brownlee® C18 (7 µm, 1,5 x 3,2 mm) da Perkin Elmer®.

No método de pré-preparo de amostras foram utilizados processador de alimentos da marca Mallory, biofreezer Thermo® (San Jose, CA, EUA), liofilizador modelo L101 Liobrás® (São Carlos, SP, Brasil), moinho analítico modelo A11 Basic Mill IKA® (Staufen, Alemanha), tamizador modelo AS200 Retch® (Haan, Alemanha). Também foi utilizado material consumível como microtubos de 1,5 mL Eppendorf® (Hamburgo, Alemanha), tubos de 15 mL Falcon™ e filtros em polietileno com

membrana de PTFE (0,22 μm de poro, 13 mm de diâmetro) Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha).

3.1.4 Amostras

Para o desenvolvimento do método de extração foram adquiridas amostras de peito de frango orgânico da Korin® (Ipeúna, SP, Brasil). As aves dessa marca são submetidas a um sistema de criação sem uso de antibióticos terapêuticos ou antibióticos como melhoradores de desempenho, o que garante tecidos livres de resíduos de medicamentos veterinários, sendo utilizados como matriz branca para o desenvolvimento do estudo. Para a análise de amostras de frango convencionais, foi adquirido peito de frango de diferentes marcas de abrangência nacional. Essas amostras foram obtidas em supermercados da cidade de Ribeirão Preto.

3.2 Métodos

3.2.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação de antibióticos ionóforos por LC-ESI-MS/MS

3.2.1.1 Avaliação das condições de espectrometria de massas (ESI-MS/MS)

Inicialmente, foram definidos os íons a serem monitorados para as moléculas de LAS, MON, SAL, NAR e NIG (padrão interno). Para isso foi realizada infusão direta via espectrômetro de massas de uma solução 500,0 ng mL⁻¹ em 0,1% de ácido fórmico em metanol 90% para cada um dos antibióticos, com vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Por meio de um *split*, foi somada uma vazão de 190 $\mu\text{L min}^{-1}$ de solução 0,1% de ácido fórmico em metanol 90% via cromatógrafo líquido, correspondendo a uma vazão total de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$.

O íon molecular de cada antibiótico ionóforo foi determinado pela análise em *full scan*, sendo escolhido aquele de maior abundância relativa. Após a definição do íon molecular, os parâmetros do espectrômetro de massas como *spray voltage*, *sheath gas pressure*, *auxiliary gas flow rate*, *capillary temperature*, *tub lens*, *vaporizer temperature* e *collision energy* foram padronizados pelo *software* TSQ Tune, para a determinação dos respectivos íons produtos mais abundantes.

Para isso foi realizada obtenção de espectro no modo SRM e para cada íon molecular foram definidos os dois íons produtos mais abundantes. A fragmentação dos íons moleculares foi realizada na cela de colisão, sendo utilizado o gás argônio associado à energia de colisão específica para a geração de cada um dos íons filhos. Na fonte de ionização por eletrospray, a dessolvatação foi realizada com gás nitrogênio.

3.2.1.2 Avaliação das condições da LC

Para o desenvolvimento do método analítico de determinação dos antibióticos ionóforos, foi preparada solução com LAS, MON, SAL, NAR e NIG (padrão interno), todos na concentração de 500,0 ng mL⁻¹ em 0,1% de ácido fórmico em metanol 90%, solução preparada a partir da diluição das soluções de 1.000,0 ng mL⁻¹. Essa solução foi injetada automaticamente pelo *autosampler* em um *loop* de 20 µL e analisada por LC-ESI-MS/MS. Por meio da utilização de uma coluna em condições de fase reversa foram realizadas alterações nas condições cromatográficas para otimização do método de separação, tais como, modificações da temperatura da coluna, das fases móveis constituídas por misturas de metanol, água e ácido fórmico em diferentes proporções e, por fim, mudanças na vazão da fase móvel.

3.2.2 Desenvolvimento do método de extração de resíduos de antibióticos ionóforos em amostras de peito de frango.

O método proposto para extração de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR presentes em peito de frango foi desenvolvido a partir de modificações dos métodos descritos por Mortier; Daeseleire; Delahaut (2003) e Mortier; Daeseleire; Van Peteghem (2005), ambos para extração de antibióticos ionóforos presentes em ovos. A representação esquemática desses dois métodos está na **FIGURA 3-1**. Para adaptação desses métodos de extração para carne de frango, foram necessárias novas abordagens.

3.2.2.1 Processamento (pré-preparo) de amostra

As amostras de peito de frango orgânico foram picadas em pedaços pequenos, sendo realizados cortes transversais ao sentido das fibras musculares, no intuito de facilitar o processo de trituração. Em seguida, os pedaços foram transferidos para processador de alimentos e foi adicionado volume de água suficiente para mantê-los imersos. A trituração foi mantida até a amostra apresentar aspecto de uma pasta viscosa.

Em seguida, foi fracionada em finas camadas em recipientes próprios para liofilização, sendo levada a congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Após esta etapa, a amostra resultante foi liofilizada até a completa eliminação de água. A amostra liofilizada foi triturada em moinho até a formação de um pó, o qual foi tamisado, sendo obtidas partículas de diferentes tamanhos.

FIGURA 3-1. Representação esquemática de dois métodos de extração de resíduos de antibióticos ionóforos presentes em ovos. **Método 1:** Mortier; Daeseleire; Delahaut (2003), **Método 2:** Mortier; Daeseleire; Van Peteghem (2005).

3.2.2.2 Avaliação do tamanho de partícula da amostra

No processo de tamisação, foram utilizados tamises de 4 mm, 2 mm, 1 mm, 500 μm , 250 μm , 125 μm , 63 μm e, por fim, 45 μm . Para a determinação do melhor tamanho de partícula a ser trabalhado, foi realizado um estudo comparativo em termos de recuperação. Para isso, foram pesados 250,0 mg de amostra liofilizada em tubos de 15 mL, massa a qual foi fortificada com 500 μL da solução “mãe” B e 100 μL da solução 500,0 ng mL^{-1} do padrão interno. A concentração de LAS, MON, NAR e SAL na massa pesada após a fortificação corresponde aos seus LMRs, sendo, respectivamente, 20,0; 10,0; 100,0; e 15,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A concentração de NIG (padrão interno) na massa pesada após a fortificação foi 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Devido a perda de água, a massa de 250,0 mg de amostra liofilizada foi considerada igual a 1,0 g de amostra fresca. Após a fortificação, a amostra foi agitada por 1 minuto e acrescida de 3 mL de metanol, sendo submetida, novamente, a agitação por 1 minuto e levada a banho ultrassônico por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 4500 g por 10 minutos e, logo após, 1 mL do extrato foi filtrado em filtro de PTFE 0,22 μm e 20 μL foram injetados e analisados por LC-ESI-MS/MS.

3.2.2.3 Determinação do tipo de amostra analisada

Foi realizado um estudo comparativo em termos de recuperação, utilizando amostras frescas e amostras liofilizadas, para verificação do efeito matriz. Para esse estudo, foi pesado 1,0 g de peito de frango fresco, previamente triturado e homogeneizado em pedaços pequenos, em tubos de 15 mL. Em seguida realizou-se fortificação de cada antibiótico no valor de seu LMR por meio de 500 μL de solução “mãe” B, correspondendo, respectivamente, a uma concentração final de LAS, MON, SAL e NAR de 20,0; 10,0; 100,0 e 15,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Também foi realizada fortificação do padrão interno, por meio de 100 μL de solução 500,0 ng mL^{-1} de NIG, resultando em concentração de 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Logo após, a amostra foi agitada por 1 minuto e foram adicionados 3 mL de metanol, sendo submetida, novamente, a agitação por 1 minuto e ultrassonicação por 5 minutos. Depois disso, foi centrifugada a 4500 g por 10 minutos. Dos 2 mL de extrato obtido, 1 mL foi filtrado em filtro de PTFE 0,22 μm e volume de 20 μL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS. A outra metade do volume de extrato foi evaporada em banho de aquecimento a 60 $^{\circ}\text{C}$ e a amostra residual foi ressuspendida em 500 μL de metanol e filtrada em filtro de PTFE 0,22 μm , em seguida

volume de 20 μL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS. O mesmo procedimento foi aplicado para amostra liofilizada, sendo pesados 250,0 mg, levando em consideração a perda de água. A partir desse estudo foi possível verificar o melhor tipo de amostra a ser utilizado e a importância da evaporação do solvente de extração.

3.2.2.4 Determinação do solvente de extração

Para a escolha do solvente de extração foram avaliados, em termos de recuperação, os seguintes solventes: metanol, metanol 95% e metanol 85%. Para isso foram pesados 250,0 mg de amostra liofilizada, massa a qual foi fortificada com 500 μL de solução “mãe” B, correspondendo a uma concentração final de LAS, MON, SAL e NAR de 20,0; 10,0; 100,0 e 15,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Também foi realizada fortificação do padrão interno, por meio de 100 μL de solução 500,0 ng mL^{-1} de NIG, resultando em concentração de 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em seguida, agitada por 1 minuto e acrescida de 3 mL do respectivo solvente. Após a adição do solvente extrator, foi agitada, novamente, por mais 1 minuto e ultrassonicada por 5 minutos. Logo após, foi centrifugada a 4500 g por 10 minutos e, em seguida, 1 mL de extrato foi evaporado a 60 °C em banho de aquecimento. A amostra residual foi ressuspensa em 500 μL de metanol e filtrada em filtros de PTFE 0,22 μm e volume de 20 μL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS. A partir desse estudo, foi possível determinar o melhor solvente de extração em termos de recuperação.

3.2.2.5 Determinação do volume do solvente de extração

Após a definição do solvente de extração, foi avaliado o melhor volume de solvente em termos de recuperação. Para isso foram pesados 250,0 mg de peito de frango liofilizado, massa a qual foi fortificada com 500 μL de solução “mãe” B, correspondendo a uma concentração final de LAS, MON, SAL e NAR de 20,0; 10,0; 100,0 e 15,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Também foi realizada fortificação do padrão interno, por meio de 100 μL de solução 500,0 ng mL^{-1} de NIG, resultando em concentração de 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em seguida, foi agitada por 1 minuto. Os volumes de solventes estudados foram 2 e 3 mL. Após a adição do solvente de extração, foi agitada, novamente, por mais 1 minuto, ultrassonicada por 5 minutos, centrifugada a 4500 g por 10 minutos e, em seguida, 1 mL de extrato foi evaporado a 60 °C em banho de aquecimento. A amostra residual foi ressuspensa em 500 μL de metanol e filtrada em

filtros de PTFE 0,22 μm e volume de 20 μL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS. A partir dos resultados obtidos, foi possível determinar o melhor volume de solvente de extração em termos de recuperação.

3.2.2.6 Determinação do volume de solvente evaporado

Para a finalização do desenvolvimento do método de extração, foi determinado em termos de recuperação o volume de solvente de extração evaporado, sendo avaliados volumes de 1 e 2 mL. Para isso, foram pesados 250,0 mg de peito de frango liofilizado, em seguida a amostra foi fortificada com 500 μL de solução “mãe” B, correspondendo a uma concentração final de LAS, MON, SAL e NAR de 20,0; 10,0; 100,0 e 15,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Também foi realizada fortificação do padrão interno, por meio de 100 μL de solução 500,0 ng mL^{-1} de NIG, resultando em concentração de 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em seguida, foi agitada por 1 minuto, acrescida de solvente de extração, agitada, novamente, por 1 minuto, ultrassonicada por 5 minutos, centrifugada a 4500 g por 10 minutos. Volumes de 1 e 2 mL de extrato foram evaporados em banho de aquecimento a 60 $^{\circ}\text{C}$, em seguida a amostra residual foi ressuspensa em 500 μL de metanol, filtrada em filtros de PTFE e volume de 20 μL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS.

3.2.3 Validação do método analítico

Inicialmente, a validação do método analítico foi realizada de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do PNRC/Animal, instituído pelo MAPA por meio da Instrução Normativa nº 24, de 14 de Julho de 2009. Posteriormente, foram seguidas as normas estabelecidas pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica (*International Standard Book Number* - ISBN 978-85-7991-055-5) instituídas pelo MAPA por meio da Instrução Normativa nº 16 de 17 de Maio de 2013, a qual revogou a Instrução Normativa apresentada anteriormente.

De acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica a validação de procedimentos analíticos para determinação de medicamentos veterinários e contaminantes orgânicos em matrizes de origem animal deverá ser conduzida observando-se os seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, seletividade, efeito

matriz, recuperação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) e, por fim, robustez. Somado a esses parâmetros analíticos também foram determinados o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ).

3.2.3.1 *Linearidade*

Na validação do método para determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR em peito de frango, a linearidade foi avaliada construindo-se três tipos de curvas analíticas: Curva de Calibração do Analito em Solução (CCAS), construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente; Curva de Calibração da Matriz Branca Fortificada (CCMBF), construída a partir de matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro; Curva de Calibração do Extrato da Matriz Branca Fortificado (CCEMBF), construída a partir do extrato da matriz branca fortificado com os padrões de calibração do analito puro.

Os três tipos de curva analítica continham cinco diferentes concentrações, compreendendo 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 vezes o LMR de cada antibiótico em estudo, fazendo com que o LMR se encontrasse na região central da curva, conforme apresentado na **TABELA 3-2**. A partir das soluções “mãe” A, B, C e D foram preparados cada um dos padrões de calibração: da solução “mãe” A, a concentração 2; da solução “mãe” B, a concentração 3; da solução “mãe” C, a concentração 4; da solução mãe D, a concentração 5. A concentração 1 corresponde ao branco, o qual não apresenta nenhum dos antibióticos em estudo.

Para o preparo dos padrões de calibração, 500 μL da solução “mãe” correspondente foram pipetados em microtubos de 1,5 mL, em seguida foram pipetados 100 μL da solução 500,0 ng mL^{-1} do padrão interno NIG e, por fim, 400 μL do extrato/solvente, completando um volume total de 1 mL. Para a CCAS foi utilizado como solvente metanol 90%, enquanto para CCEMBF foi utilizado extrato de frango liofilizado. Para a obtenção do extrato de amostra liofilizada, foram pesados em quintuplicata 250,0 mg da amostra, na qual foram adicionados 3 mL de solvente de extração, sendo agitada por 1 minuto, ultrassonicada por 5 minutos, centrifugada por 10 minutos e, por fim, filtrada em filtros de PTFE 0,22 μm . A CCMBF foi construída a partir da fortificação de 250,0 mg de peito de frango liofilizado com 500 μL da solução mãe correspondente a cada padrão de calibração, em seguida foi adicionado o padrão

interno por meio da pipetagem de 100 μL da solução 500,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de NIG. Após a fortificação, todos os pontos passaram pelo processo de extração. Cada um dos cinco pontos dos três tipos de curva (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 vezes o LMR) foram preparados em sextuplicata a partir das quatro soluções “mãe” (A, B, C e D), com exceção da concentração 1, e injetados para análise em LC-ESI-MS/MS. As áreas dos picos foram determinadas e colocadas no eixo das ordenadas e as concentrações de cada antibiótico foram colocadas no eixo das abscissas. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados, em que a variável independente refere-se à concentração teórica de cada antibiótico. A regressão foi representada graficamente pela equação da reta e a correlação pelos coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2).

TABELA 3.2. Concentração dos antibióticos na CCAS, CCMBF e CCEMBF.

Concentração	Lasalocida (ng mL ⁻¹)	Monensina (ng mL ⁻¹)	Salinomicina (ng mL ⁻¹)	Narasina (ng mL ⁻¹)	Nigericina (ng mL ⁻¹)
1	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0
2	10,0	5,0	50,0	7,5	50,0
3	20,0	10,0	100,0	15,0	50,0
4	30,0	15,0	150,0	22,5	50,0
5	40,0	20,0	200,0	30,0	50,0

3.2.3.2 Seletividade

É a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. A seletividade do método proposto foi avaliada por meio do efeito matriz.

3.2.3.3 Efeito Matriz

É um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. O efeito matriz foi avaliado por meio da construção de dois tipos de curva analítica, CCAS e CCEMBF, construídas conforme apresentado no item 3.2.3.1. O

efeito matriz foi verificado por meio da comparação dos interceptos e as inclinações da CCMBF em relação aos da CCAS.

3.2.3.4 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram calculados diretamente usando a CCAS e a CCMBF. Por meio da CCAS foram obtidos os valores de LD e LQ instrumentais. A partir da CCMBF foram determinados os valores de LD e LQ experimentais. Para o cálculo do LD e do LQ instrumental e experimental, foram utilizados os valores do *slope* (inclinação da curva) e do desvio padrão (DP) do intercepto das médias de três curvas CCAS e CCMBF, respectivamente. Os fatores 3,3 e 10,0 para LD e LQ, nessa ordem, foram multiplicados pelo quociente entre o desvio padrão do intercepto e a média do *slope*.

O LD foi calculado pela **Equação 1**:

(1)

$$LOD = 3,3 \times \frac{DP \text{ do intercepto}}{\text{média inclinação da curva}}$$

Onde: DP corresponde ao desvio padrão das médias dos interceptos

O LQ foi calculado pela **Equação 2**:

(2)

$$LOQ = 10 \times \frac{DP \text{ do intercepto}}{\text{média inclinação da curva}}$$

Onde: DP corresponde ao desvio padrão das médias dos interceptos

3.2.3.5 Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial)

É o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. As medidas podem ser simultâneas (repetitividade) em uma mesma análise e podem ser intercaladas (reprodutibilidade intralaboratorial) em análises diferentes. Esse parâmetro é calculado pelo coeficiente de variação (CV) de acordo com a **Equação 3**:

(3)

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{M}} \times 100$$

Onde: *SD* representa a estimativa do desvio padrão e $\bar{M}$ a média dos valores de concentrações obtidos das amostras analisadas em replicata.

A precisão do método foi determinada por meio da avaliação da repetitividade e da reprodutibilidade intralaboratorial. A repetitividade foi avaliada em seis réplicas e em três diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR de cada antibiótico) no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A reprodutibilidade intralaboratorial também foi avaliada em seis réplicas e em três concentrações diferentes, assim como para a repetitividade, mas em três dias diferentes.

Para avaliar esses parâmetros, 250,0 mg de peito de frango liofilizado foram fortificados com as respectivas concentrações, sendo 500 µL da solução “mãe” A para a concentração 0,5 vezes LMR, 500 µL da solução “mãe” B para a concentração igual ao LMR e 500 µL da solução “mãe” C para o nível 2,0 vezes LMR. Somado ao volume de cada solução mãe, foram pipetados 100,0 µL da solução 500,0 ng mL⁻¹ de NIG, utilizado como padrão interno, resultando em uma concentração de 50 µg kg⁻¹. Em seguida, a amostra foi agitada por 1 minuto e após foi adicionado o volume do solvente de extração, sendo agitado por mais 1 minuto, ultrassonicado por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 4500 g. Do extrato resultante, 1 mL foi evaporado e a amostra residual foi ressuspensa em 500,0 µL de metanol. Logo após, realizou-se filtração em filtros de PTFE 0,22 µm e volume de 20 µL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS.

3.2.3.6 Recuperação

A recuperação pode ser definida como a fração da quantidade total do analito presente na amostra, a qual é obtida após a finalização do processo de extração. Tem como objetivo a correção dos erros sistemáticos oriundos das etapas do método analítico. O cálculo da recuperação foi realizado por meio da **Equação 4**:

(4)

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1}{C2} \times 100$$

Onde: C1 equivale ao teor medido após o processo de extração e C2 equivale à concentração teórica de fortificação.

A recuperação foi determinada por meio da análise de seis réplicas de peito de frango liofilizado, fortificado com padrões em três concentrações, correspondentes a 0,5; 1,0 e 1,5 vezes o LMR de cada antibiótico. Cada concentração

foi preparada a partir da fortificação de 250,0 mg de peito de frango liofilizado com 500 µL da solução “mãe” A para a concentração 0,5 vezes LMR, 500 µL da solução “mãe” B para a concentração igual ao LMR e 500 µL da solução “mãe” C para a concentração 2,0 vezes LMR. Somado ao volume de cada solução “mãe”, foram pipetados 100 µL da solução 500,0 ng mL⁻¹ de NIG, utilizado como padrão interno, resultando em uma concentração de 50 µg kg⁻¹. Em seguida, a amostra foi agitada por 1 minuto e após foi adicionado o volume do solvente de extração, sendo agitado por mais 1 minuto, ultrassonicado por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 4500 g. Do extrato resultante, 1 mL foi evaporado e a amostra residual foi ressuspensa em 500 µL de metanol. Logo após, realizou-se filtração em filtros de PTFE 0,22 µm e volume de 20 µL foi injetado e analisado por LC-ESI-MS/MS.

3.2.3.7 Limite de Decisão (CC α) e Capacidade de Detecção (CC β)

São parâmetros que medem o desempenho do procedimento analítico, levando em consideração a incerteza da medição no nível de concentração no qual se toma alguma decisão, chamado de nível de interesse, no caso representado pelo LMR de cada antibiótico. O CC α e o CC β foram calculados a partir dos resultados de análise de 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR de cada antibiótico, utilizadas para a determinação da reprodutibilidade intralaboratorial.

O limite de decisão (CC α) foi calculado pela **Equação 5**:

(5)

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times s$$

Onde: s é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMR de cada antibiótico, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

A capacidade de detecção (CC β) foi calculada pela **Equação 6**:

(6)

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times s$$

Onde: s é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas dessa série de 20 análises no nível de concentração do LMR de cada antibiótico, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial e CC α é o limite de decisão, cujo valor é obtido por meio da Equação 5.

Os valores utilizados para o cálculo do $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram obtidos a partir dos testes de reprodutibilidade intralaboratorial, por meio dos valores encontrados para a concentração correspondente ao LMR de cada antibiótico.

3.2.3.8 Robustez

É responsável pela medição da performance de um método frente a pequenas variações, como por exemplo vazão, temperatura da coluna e lotes de coluna cromatográfica. Para essa análise, foi utilizada uma amostra fortificada na concentração do LMR para cada um dos antibióticos, a qual foi submetida ao processo de extração e análise por LC-ESI-MS/MS. Esta amostra foi injetada frente a algumas variações do método cromatográfico, tais como vazão, temperatura da coluna e diferentes lotes da mesma coluna (C18). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos em amostras analisadas no método estabelecido.

3.2.4 Aplicação do método

Após o desenvolvimento e validação, o método foi aplicado em 18 amostras de peito de frango disponíveis comercialmente em supermercados de Ribeirão Preto, SP. Foram analisados três lotes de seis marcas de abrangência nacional. Para cada amostra foram analisadas seis réplicas e calculada a média da concentração dos resíduos de LAS, MON, SAL, NAR quando possível.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições LC-ESI-MS/MS para determinação de LAS, MON, SAL e NAR

4.1.1 Determinação dos íons moleculares e íons produtos

O espectro de massas, adquirido em análise ESI-MS por *full scan* em modo positivo para cada um dos antibióticos ionóforos, apresentou como íon mais abundante o complexo formado entre a molécula e o cátion sódio, representado genericamente por $[M+Na]^+$. Assim, os íons moleculares sodiados foram m/z 613 para LAS, m/z 693 para MON, m/z 747 para NIG, m/z 773 para SAL, e, por fim, m/z 787 NAR (**FIGURA 4-1-A, FIGURA 4-2-A, FIGURA 4-3-A, FIGURA 4-4-A, FIGURA 4-5-A**).

A alta afinidade dos cátions de metais alcalinos pelos antibióticos ionóforos foi observada pela predominância de íons moleculares sodiados e a ausência de íons moleculares protonados $[M+H]^+$. Além dessa maior afinidade por cátions de metais alcalinos, a adição de ácido fórmico na solução de análise e na fase móvel favorece a aquisição de espectros de massas constituídos quase exclusivamente por $[M+Na]^+$ (VOLMER; LOCK, 2002). Esse efeito ocorre em baixos valores de pH devido a protonação da carboxila terminal, o que elimina ou reduz a formação de outras espécies de íons moleculares (VOLMER; LOCK, 2002). A formação de adutos com íons como Na^+ , K^+ e NH_4^+ identifica moléculas pouco básicas, ou seja, que apresentam dificuldade em receber prótons. Assim, as moléculas dos antibióticos em estudo, apresentam baixa basicidade, pois como é visto pelos espectros apresentados.

O íon molecular sodiado de cada antibiótico ionóforo foi submetido à dissociação induzida por colisão (*collision-induced dissociation*, CID) em análise ESI-MS/MS, sendo realizado um ajuste automático por meio do *software* TSQ Tune do espectrômetro de massas, para a determinação dos dois íons produtos de maior abundância relativa (**FIGURA 4.1-B, FIGURA 4.2-B, FIGURA 4.3-B, FIGURA 4.4-B, FIGURA 4.5-B**). O monitoramento dos íons produtos no processo cromatográfico se deu por SRM em modo positivo. Para cada íon filho formado foram definidos parâmetros específicos como *tube lens* e *collision energy* (**TABELA 4.1.**).

Outros parâmetros instrumentais também foram padronizados para aumento da sensibilidade do espectrômetro de massas para os íons moleculares sodiados dos antibióticos ionóforos na análise ESI-MS/MS. Esses parâmetros foram: *vaporizer*

temperature, sheath gas pressure, ion sweep gas pressure, auxiliary gas pressure, capillary temperature e capillary offset (TABELA 4.2).

TABELA 4-1. Condições MS/MS

	<i>Tube Lens</i> (V)	<i>m/z</i> Íon Molecular	<i>m/z</i> Íons Filhos	<i>Collision Energy</i> (eV)
LASALOCIDA	120	613	377* 577	34 32
MONENSINA	139	693	675* 461	34 51
NIGERICINA	126	747	703* 729	53 22
SALINOMICINA	144	773	431* 531	49 41
NARASINA	145	787	431* 531	50 43

TABELA 4-2. Condições da fonte de ionização por eletrospray (ESI)

Condições ESI	Valores Otimizados
<i>Spray Voltage</i>	4000 V
<i>Vaporizer Temperature</i>	400 °C
<i>Sheath Gas Pressure</i>	55 psi
<i>Ion Sweep Gas Pressure</i>	0
<i>Auxiliary Gas Pressure</i>	20 psi
<i>Capillary Temperature</i>	300 °C
<i>Capillary Offset</i>	35 V

Os espectros de massas dos fragmentos desses íons moleculares, geralmente, apresentam a perda de água [M+Na-H₂O] como pico característico. Além desse fragmento, os poliéteres ionóforos que contêm um grupo cetona, como LAS, SAL e NAR, originam fragmentos a partir de reações de β-eliminação, em ambos os lados da cadeia alquila em relação à carbonila (MARTÍNEZ-VILLALBA; MOYANO;

GALCERAN, 2009). Esse mecanismo é iniciado pelo cátion, na maioria das vezes Na^+ , que ao se complexar com a molécula do ionóforo induz um aumento da densidade eletrônica no oxigênio da carbonila, resultando na dissociação das ligações C-C, caracterizando uma β -eliminação (LOPES et al.; 2002 (A)).

No processo de fragmentação dos antibióticos ionóforos, o fragmento que contém o grupo carboxílico terminal é denominado de Tipo A, já o íon produto que apresenta o grupo hidroxílico terminal recebe a denominação de Tipo F (KIM et al., 1996). Essa nomenclatura é utilizada para um melhor entendimento dos mecanismos de fragmentação dos íons moleculares sodiados dos antibióticos ionóforos em estudo.

O íon molecular sodiado de LAS m/z 613 ao sofrer fragmentação originou o íon produto Tipo F m/z 377, o qual apresenta maior abundância relativa dentre os íons produto. A formação deste fragmento ocorre por meio de uma β -eliminação a partir da dissociação da ligação entre os C(11)-C(12) (LOPES et al., 2002 (A)). Ao sofrer a perda sucessiva de duas moléculas de H_2O , o mesmo íon molecular sodiado originou o fragmento m/z 577, sendo o segundo em abundância relativa (MARTÍNEZ-VILLALBA; MOYANO; GALCERAN, 2009).

O íon molecular sodiado de MON m/z 693, ao sofrer a perda de uma molécula de H_2O originou o fragmento m/z 675, sendo o de maior abundância relativa. O segundo maior em abundância relativa é o íon produto m/z 461. O mecanismo de formação desse fragmento é iniciado por meio da migração do H da hidroxila referente ao O (5) para O (4) do éter cíclico, gerando o fragmento m/z 507 por meio de uma fragmentação via mecanismo de Grob-Wharton. Esse fragmento sofre perda de CO, originando um novo íon produto m/z 479, o qual por sua vez sofre a perda de uma molécula de H_2O , resultando no íon filho Tipo F de m/z 461 (LOPES et al., 2002 (B)).

A NIG é um antibiótico ionóforo não empregado como medicamento veterinário, apresenta característica química e estrutural semelhante aos dos antibióticos ionóforos em estudo. É uma molécula largamente utilizada como padrão interno de métodos analíticos para determinação de antibióticos ionóforos. A fragmentação de seu íon molecular sodiado m/z 747 resultou nos íons produtos m/z 729, a partir da perda de uma molécula de H_2O , e m/z 703, originado a partir da perda de uma molécula de CO_2 , resultando no fragmento de maior abundância relativa (MARTÍNEZ-VILLALBA; MOYANO; GALCERAN, 2009).

A principal via de fragmentação do íon molecular sodiado, tanto da SAL quanto da NAR, envolve o mecanismo de β -eliminação representado pela dissociação da ligação C-C ativada pelo oxigênio da carbonila do C(11). Pode ocorrer a dissociação da ligação C-C de ambos os lados do C(11) (MIAO et al., 2003). Para a dissociação entre os C(12) e C(13) é formado o fragmento Tipo F m/z 431 tanto para SAL quanto para NAR. A quebra entre os C(9) e C(10) resulta na formação do fragmento Tipo F m/z 531 (MIAO et al., 2003; MARTÍNEZ-VILLALBA; MOYANO; GÁLGERAN, 2009). O íon produto m/z 431 é o de maior abundância relativa para o íon molecular sodiado das duas moléculas, enquanto o fragmento m/z 531 apresenta a segunda maior abundância. A única diferença estrutural entre as moléculas de NAR e SAL é que a primeira apresenta uma metila no C(4), enquanto a segunda não apresenta.

O íon produto mais abundante foi utilizado no processo de quantificação do método analítico desenvolvido. A aquisição do espectro no processo cromatográfico foi feita em SRM no modo positivo a partir do monitoramento dos seguintes canais de transição: 613 > 337 e 613 > 595 para LAS, 693 > 675 e 693 > 461 para MON, 773 > 431 e 773 > 531 para SAL, 787 > 431 e 787 > 531 para NAR e, por fim, 747 > 703 e 747 > 729 para NIG.

As análises por *full scan* resultam na ionização de todos os compostos presentes nas amostras. São aplicadas em análises qualitativas ou de perfil químico, mas não são aplicadas a análises quantitativas, devido à baixa seletividade que apresenta. Isso ocorre, porque em matrizes complexas, a presença de compostos com alta capacidade de ionizar pode suprimir os demais sinais. Assim, outros métodos de aquisição de espectros são empregados em análises quantitativas, como o SRM, o qual é mais seletivo e sensível que o *full scan*.

FIGURA 4-1. Espectro de Massas de LAS: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos

FIGURA 4-2. Espectro de Massas de MON: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos

2

FIGURA 4-3. Espectro de Massas de NIG: **(A)** Íon Molecular **(B)** Íons Produtos

FIGURA 4-4. Espectro de Massas de SAL: (A) Íon Molecular (B) Íons Produtos

FIGURA 4-5. Espectro de Massas de NAR: **(A)** Íon Molecular **(B)** Íons Produtos

4.1.2 Otimização das condições cromatográficas

As condições analíticas foram otimizadas após serem avaliados diferentes parâmetros, como temperatura da coluna analítica, composição das fases móveis constituídas por misturas de metanol, água e ácido fórmico em diferentes proporções e, por fim, mudanças na vazão da fase móvel. Esses parâmetros foram ajustados para obter formato de pico desejável e menor tempo de análise.

Inicialmente, foi desenvolvido um método analítico com eluição por gradiente, com fase móvel constituída por 0,1% de ácido fórmico em metanol 5% e 0,1% de ácido fórmico em metanol, com vazão de 0,6 mL min⁻¹ e com tempo total de corrida de 16 minutos. Foi utilizada uma coluna C18 mantida a 30° C e o volume de injeção foi 10 µL. A eluição das moléculas ocorreu entre 6 e 8 minutos, no momento em que a fase móvel era constituída por 95% de 0,1% de ácido fórmico em metanol e 5% de 0,1% de ácido fórmico em metanol 5%. No intuito de diminuir o tempo de análise e o consumo de solvente orgânico, foi desenvolvido um método analítico mais rápido para determinação desses antibióticos.

Para isso foi proposta eluição isocrática, sendo estudadas diferentes proporções da fase móvel, constituída por 0,1% de ácido fórmico em metanol e 0,1% de ácido fórmico em água. A temperatura da coluna foi avaliada no intervalo entre 30° C e 40° C. A vazão também foi avaliada, em um intervalo entre 0,5 mL min⁻¹ e 1 mL min⁻¹. A condição analítica otimizada foi: 0,1% de ácido fórmico em metanol: 0,1% de ácido fórmico em água (94: 6, v/v) como fase móvel, coluna C18 mantida a 40° C, vazão 0,850 mL min⁻¹ com *split* e detecção por ESI-MS/MS (**TABELA 4-3**).

A constituição da fase móvel é um parâmetro a ser avaliado devido sua importância no processo de ionização das moléculas na análise por LC-ESI-MS/MS. Na ESI ocorre ionização das moléculas em solução, assim é preciso que as moléculas sofram ionização ao reagirem com a fase móvel, caracterizando uma reação ácido-base. A ESI atua como um transportador de íons da fase condensada para a fase gasosa, por isso o emprego de solventes orgânicos como metanol e acetonitrila facilitam esse processo de evaporação da fase móvel. A presença de água também é importante, pois por meio da eletrólise ocorre formação de íons.

TABELA 4-3. Condições cromatográficas para determinação de LAS, MON, SAL e NAR

Condições Cromatográficas	Método Otimizado
Equipamento	Accela LC <i>System</i> Thermo Scientific®
Fase móvel	0,1% ácido fórmico em metanol/ 0,1% ácido fórmico em água (94: 6, v/v)
Coluna	Brownlee® C18 (5 µm – 100,0 x 4,6 mm) Perkin Elmer®
Coluna de guarda	Brownlee® C18 (7 µm, 1,5 x 3,2 mm) da Perkin Elmer®
Vazão	0,850 mL min ⁻¹ (com <i>split</i>)
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	40° C
Temperatura do <i>autosampler</i>	18° C
Tempo de corrida	7 minutos

Para ESI é aconselhável o uso de vazão de no máximo 0,6 mL min⁻¹, pois assim é utilizada menor temperatura de vaporização e não há riscos de gotejamento da fase móvel na fonte. Vazões maiores comprometem análises quantitativas por LC-ESI-MS/MS, uma vez que a vaporização da fase móvel não ocorre adequadamente, causando oscilações nos resultados obtidos. Sendo assim, foi utilizado um *split* pós-coluna que nada mais é do que um divisor físico de vazão. Por meio da utilização desse dispositivo, aproximadamente metade da vazão de 0,850 mL min⁻¹ foi direcionada para a fonte de ionização. A utilização do *split* não compromete a análise, pois não ocorre redução da intensidade do sinal.

Embora a maioria dos métodos descritos para a determinação de antibióticos ionóforos em tecidos animais não empreguem a utilização de sais na fase móvel, alguns trabalhos empregam acetato de sódio (GALARINI et al., 2011) e acetato de amônio (ROKKA; PELTONEN, 2006) como aditivos. A adição de acetato de sódio por um lado promove o desaparecimento quase completo de adutos como $[M+H]^+$ e $[M+H-nH_2O]^+$, por outro lado favorece a formação intensa de espécies di-sódio $[M+2Na]^+$ com todos os ionóforos (VOLMER; LOCK, 1998).

A adição de sais de amônio na fase móvel também não é vantajosa, apesar de serem mais voláteis do que os sais de sódio, os íons formados $[M+NH_4]^+$ são muito instáveis e sofrem notável dissociação ainda na fonte de ionização em várias espécies desidratadas, até mesmo em baixa diferença de potencial (VOLMER; LOCK, 1998).

Além disso, mesmo com grandes concentrações de íons de amônio presentes na fase móvel, os sinais mais abundantes correspondem aos adutos formados com o íon sódio (VOLMER; LOCK, 1998). Diante dessas informações, para o desenvolvimento do método cromatográfico não foi empregado nenhum desses sais.

Ao contrário da adição de sais de sódio ou amônio, a acidificação da fase móvel com ácido fórmico garante a obtenção de espectros muito limpos, constituídos quase que exclusivamente por íons sodiados $[M+Na]^+$, conforme verificado (**FIGURA 4-1-A**, **FIGURA 4-2-A**, **FIGURA 4-3-A**, **FIGURA 4-4-A**, **FIGURA 4-5-A**). Isso ocorre devido a protonação do grupo carboxílico terminal a baixos valores de pH, o que elimina ou reduz a possibilidade formação de outros íons (VOLMER; LOCK, 1998). A presença de ácido fórmico na fase móvel também melhora a resolução dos picos nos cromatogramas (MORTIER; DAESELEIRE; PETEGHEM, 2005).

No desenvolvimento de um método analítico por LC-ESI-MS/MS deve haver um equilíbrio entre uma boa ionização e uma boa separação cromatográfica. No entanto, na maioria das vezes é priorizada uma boa ionização das moléculas em estudo em vez de uma boa separação cromatográfica. Isso ocorre devido à aplicação do monitoramento de reação selecionada (SRM) em uma análise LC-ESI-MS/MS. Nesse modo de aquisição de espectros um íon molecular é selecionado no primeiro quadrupolo (Q_1), sendo fragmentado no segundo quadrupolo (q_2 - cela de colisão) por uma energia de colisão específica e, por fim, um determinado número de íons produto é selecionado no terceiro quadrupolo (Q_3).

Dessa forma, caso ocorra coeluição de compostos na separação cromatográfica, não haverá comprometimento da análise, visto que cada molécula será analisada em um canal de transição específico do SRM. Trata-se de um modo de aquisição de espectro muito seletivo, o qual garante a identificação de compostos com mesmo tempo de retenção. É um monitoramento muito utilizado em análises multirresíduos, em que um grande número de compostos é identificado e quantificado no mesmo método analítico.

No método analítico proposto, LAS ($t_R=2,48$ min) e MON ($t_R=2,52$ min) apresentaram tempos de retenção muito próximos, enquanto NIG ($t_R=3,78$ min), SAL ($t_R=3,05$ min) e NAR ($t_R=3,51$ min) apresentaram tempos de retenção mais distantes (**FIGURA 4-6**). A coeluição de LAS e MON também ocorreu em um método analítico descrito por Martínez-Villalba et al. (2009), proposto para a separação cromatográfica de oito antibióticos ionóforos. Nesse método, também foi utilizada uma coluna C18, com

eluição por gradiente com fase móvel constituída por 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água. Por meio dessas informações pode-se dizer que a seletividade tanto do metanol quanto da acetonitrila é semelhante para as duas moléculas, assim como a afinidade dessas moléculas pela fase estacionária C18.

FIGURA 4-6. Cromatograma obtido a partir da análise de matriz fortificada com LAS ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), MON ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$), SAL ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) e NAR ($15 \mu\text{g kg}^{-1}$) na concentração de seus respectivos LMRs e NIG ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$).

4.2 Otimização do método de extração de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR de amostras de peito de frango

4.2.1 Processamento (pré-preparo) de amostras de peito de frango

Após a liofilização de 1635 g de peito de frango fresco foram obtidos 380 g de peito de frango liofilizado, o que corresponde, aproximadamente, a 77% de água. No entanto, o valor correspondente à porcentagem de água no peito de frango é um pouco menor, uma vez que ocorrem perdas de amostra tanto na trituração no processador de alimentos, quanto no processo de liofilização, levando a um resultado de porcentagem de água maior. Para uma determinação mais exata da porcentagem de água, seria necessária a utilização de liofilizadores mais potentes, capazes de liofilizarem pedaços inteiros de amostra sem prévia trituração.

De acordo com o Banco Nacional de Dados de Nutrientes de Referência Padrão (*National Nutrient Database for Standard Reference*) elaborado pelo Serviço de Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*Agricultural Research Service of United States Department of Agriculture – USDA*) (USDA, 2001), aproximadamente 75% da carne fresca de frango é composta por água. Assim, para este trabalho foi adotada a porcentagem de água estabelecida pelo USDA, para a determinação da proporção de massa fresca e massa liofilizada a ser utilizada em estudos comparativos.

Após a liofilização, as amostras de peito de frango liofilizadas foram trituradas em moinho de mão e, em seguida, submetidas à tamisação em tamises de 4 mm, 2 mm, 1 mm, 500 μm , 250 μm , 125 μm , 63 μm e, por fim, 45 μm . A partir dessa última etapa de processamento, foram obtidas partículas com os seguintes tamanhos (T): 45 $\mu\text{m} < T < 63 \mu\text{m}$, 63 $\mu\text{m} < T < 125 \mu\text{m}$, 125 $\mu\text{m} < T < 250 \mu\text{m}$, 250 $\mu\text{m} < T < 500 \mu\text{m}$. Esses tamanhos de partículas corresponderam às massas obtidas em maior quantidade.

Como foi visto, os antibióticos ionóforos apresentam afinidade pelos músculos cardíaco e esquelético (MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2004). Dessa forma, processos de pré-preparo de amostras que garantam a homogeneidade são fundamentais para a representatividade da massa a ser analisada. Ou seja, como não há uma distribuição uniforme dos resíduos pelos músculos de frango, é necessário que a amostra seja processada no intuito de a quantidade de massa a ser analisada não represente um falso negativo ou falso positivo.

Dessa forma, a eficiência dos processos de trituração do peito de frango liofilizado e tamisação garantem a formação de partículas menores. Essas partículas podem ser selecionadas de acordo com o tamanho, o que garante uma melhor homogeneidade e também facilita o processo de extração. A análise de amostras com tamanho de partícula controlado, associada à UAE, aumenta a capacidade de recuperação do analito, uma vez que os resíduos de medicamentos ficam mais disponíveis para serem extraídos da fibra muscular pelo solvente de extração.

4.2.2 Definição do tamanho de partícula da amostra

O MAPA, por meio do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA/ACS, 2011), estabelece que métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais devem apresentar recuperação de 80% a 110% para concentrações maiores ou iguais a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Neste estudo foram utilizados os LMRs de cada antibiótico para fortificação das amostras, assim todos foram incluídos nesse intervalo de recuperação.

De acordo com o resultado obtido (**FIGURA 4-7**), as partículas com tamanho (T) entre $125 \mu\text{m}$ e $250 \mu\text{m}$, foram as que apresentam recuperação acima de 80% para todos os antibióticos em análise. A recuperação foi 87,1% para LAS; 87,4% para MON; 83,5% para SAL e 80,8% para NAR. Os demais tamanhos de partículas não apresentaram recuperação superior a 80% para todos os antibióticos. Além disso, foi buscada a homogeneidade dos resultados obtidos, ou seja, a semelhança entre a recuperação de cada antibiótico.

*T é dado em μm

FIGURA 4-7. Recuperação em função do tamanho de partícula.

4.2.3 Escolha do tipo de amostra analisada

A maioria dos métodos propostos para a extração de resíduos de medicamentos veterinários em tecidos animais descrevem a utilização de amostras frescas, as quais são processadas para redução do tamanho. Como foi dito, o intuito da liofilização da amostra é garantir uma melhor homogeneidade da amostra a ser analisada e facilitar o processo de extração.

De acordo com os resultados obtidos (**FIGURA 4-8**), todos os antibióticos em análise apresentam recuperação superior a 80%, tanto para amostras frescas quanto para amostras liofilizadas com tamanho de partícula definido de acordo com o **item 4.2.2**. No entanto, levando em consideração a evaporação do extrato após a centrifugação, as amostras liofilizadas garantem melhor recuperação.

Mortier, Daeseleire e Delahaut (2003) propuseram um método para extração de cinco coccidiostáticos (diclazuril, dimetridazol, halofuginona, robenidina, nicarbazina) de ovos frescos. Nesse método proposto 10 mL de extrato obtido após a centrifugação eram reduzidos a 4 mL por meio de evaporação em banho de aquecimento sob

atmosfera de nitrogênio e volume de 40 μ L era injetado para análise por LC-ESI-MS/MS.

Em 2005, Mortier, Daeseleire e Peteghem propuseram um método para extração de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR de ovos. Nessa nova metodologia, 10 mL de extrato eram evaporados após a centrifugação, em seguida eram ressuspensos em 500 μ L de fase móvel. Nesse novo método foi verificado o aumento da sensibilidade devido à evaporação do extrato e estabilização dos tempos de retenção por meio da utilização da fase móvel como solvente de ressuspensão. No resultado apresentado (**FIGURA 4-8**), esse aumento da sensibilidade devido à evaporação do solvente de extração é verificado para a amostra liofilizada.

Para a extração da amostra liofilizada com evaporação do solvente de extração foram obtidos recuperações com valores mais próximos para todos os antibióticos e baixos valores de DP. Assim, a amostra liofilizada demonstrou ser mais apropriada em relação à amostra fresca para o desenvolvimento do método de extração. Além disso, a ressuspensão em fase móvel garante a estabilização dos tempos de retenção, o que é importante para a quantificação a partir da integração dos picos cromatográficos (MORTIER; DAESELEIRE; PETEGHEM, 2005).

FIGURA 4-8. Influência do tipo de amostra (fresca e liofilizada) e influência da evaporação do solvente de extração para o processo de extração.

4.2.4 Definição do solvente de extração

A maioria dos métodos de extração de antibióticos ionóforos de biomatrizes utilizam acetonitrila como solvente extrator. O uso de misturas de metanol e água também é eficaz, no entanto essas misturas são relativamente resistentes no que diz respeito à proporção de mistura usada, o que pode promover a extração de contaminantes, por exemplo, ácidos graxos e compostos polares (FEDENIUK; SHAND, 1998).

No método proposto foi utilizado metanol como solvente de extração, devido ao seu menor custo e facilidade de aquisição. No método cromatográfico também foi empregado metanol na fase móvel, o que favorece a diminuição da temperatura de evaporação na ESI, uma vez que o metanol apresenta temperatura de evaporação menor do que a acetonitrila. Além disso, o uso de metanol como solvente de extração reduz o tempo de evaporação do extrato após a centrifugação devido à baixa temperatura de evaporação.

No intuito de avaliar a eficiência de extração da mistura de metanol e água, foi realizada uma comparação em termos de recuperação de metanol e das soluções metanol 95% e metanol 85%. De acordo com o resultado obtido (**FIGURA 4-9**) metanol apresentou o melhor resultado para os antibióticos em estudo, todos apresentaram recuperação com valores superiores a 80% conforme preconiza o MAPA e baixos valores de DP. A solução de metanol 95% apresentou bons valores de recuperação, porém apresentou valores de DP maiores. Para a solução de metanol 85%, foram encontrados valores de recuperação abaixo de 80% para LAS e NAR, além disso, os DP foram maiores. Assim, para este estudo foi utilizado metanol como solvente de extração.

Vários métodos descrevem a aplicação de diferentes etapas de *clean up* para a eliminação de interferentes de matriz. No método proposto foi empregado um método simples e rápido para eliminação de interferentes que consistiu na filtração em membranas de PTFE de 0,22 μm . A eficiência encontrada é bem menor do que a aplicação de métodos de *clean up* como SPE, no entanto a praticidade é maior. Por ser utilizada a espectrometria de massas com aquisição por SRM, o método torna-se mais seletivo o que diminui a necessidade do emprego de etapas de *clean up* desde que não haja supressão da matriz, o que não foi verificado.

FIGURA 4-9. Avaliação do solvente de extração em termos de recuperação.

4.2.5 Definição do volume do solvente de extração

Com o objetivo de diminuir o consumo de metanol no processo de extração, foi avaliada a recuperação obtida por meio de dois volumes, 2 mL e 3 mL. De acordo com o resultado obtido (**FIGURA 4-10**) o volume de 3 mL foi que forneceu melhor resultado. Todos os antibióticos apresentaram recuperação superior a 80% e baixos valores de DP.

FIGURA 4-10. Avaliação do volume do solvente de extração.

4.2.6 Volume do solvente de evaporação

A partir da definição de 3 mL de metanol como solvente de extração, são obtidos aproximadamente 3 mL de extrato após a centrifugação. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método, foram avaliados os resultados obtidos em termos de recuperação da evaporação de 1 mL e 2 mL. De acordo com o resultado obtido (**FIGURA 4-11**), o volume de 1 mL forneceu melhor resultado, com recuperações acima de 80% e baixos valores de DP. Além disso, há maior homogeneidade entre os valores de recuperação obtidos para cada antibiótico.

FIGURA 4-11. Avaliação do volume de extrato evaporado.

4.2.7 Método de extração proposto

Após a definição das variáveis como tamanho de partícula, tipo de amostra, solvente de extração, volume do solvente de extração e volume de extrato evaporado, o método de preparo de amostra (**FIGURA 4-12**) pode ser finalizado e o processo de validação do método analítico para determinação de resíduos de LAS, MON, LAS e NAR pôde ser validado.

FIGURA 4-12. Esquema representativo do preparo de amostra de peito de frango liofilizado para determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR por LC-ESI-MS/MS.

4.3 Validação do método analítico desenvolvido para a determinação de resíduos de antibióticos ionóforos em peito de frango liofilizado

A validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (MAPA/ACS, 2011). É essencial que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório (MAPA/ACS, 2011). Dessa forma, a validação do método de análise de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR foi realizada para avaliar a quantidade desses antibióticos ionóforos presentes em peito de frango. A validação desse método seguiu recomendações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA/ACS, 2011).

4.3.1 Linearidade

É a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (MAPA/ACS, 2011). De uma forma mais geral, a linearidade mede a capacidade de um método analítico em gerar resultados proporcionais (ou outras transformações matemáticas bem definidas) às concentrações da espécie em análise, dentro de uma faixa de concentração específica.

O coeficiente de determinação (R^2) foi calculado a partir da CCAS, CCMBF e da CCEMBF (**FIGURA 4-13**; **FIGURA 4-14**; **FIGURA 4-15**; **FIGURA 4-16**). As curvas analíticas foram construídas colocando-se no eixo das abscissas as concentrações de cada antibiótico em análise e no eixo das ordenadas a razão da área do pico de cada antibiótico pela área do pico do padrão interno NIG. A curva de calibração de cada antibiótico apresentou como ponto médio o seu respectivo LMR, tendo em vista que o objetivo principal das análises realizadas para o PNCRC/Animal é avaliar se as amostras estão ou não violadas, isto é, com concentração de resíduo acima do LMR estabelecido.

FIGURA 4-13. CCAS, CCMF e CCEMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R^2) para LAS no intervalo de concentração de 0,0 a 40,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

FIGURA 4-14. CCAS, CCMF e CCEMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R^2) para MON no intervalo de concentração de 0,0 a 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

FIGURA 4-15. CCAS, CCMF e CCEMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R^2) para SAL no intervalo de concentração de 0,0 a 200,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

FIGURA 4-16. CCAS, CCMF e CCEMBF demonstrando o coeficiente de determinação (R^2) para NAR no intervalo de concentração de 0,0 a 30,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A partir da análise estatística da regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que os métodos desenvolvidos possuem excelente correlação entre concentração e resposta, visto que os valores obtidos para coeficiente de correlação (r) foram maiores que 0,98. O MAPA não especifica qual valor de r é aceitável para o estudo de linearidade, sendo assim foi tomado como base o valor 0,98 definido pela ANVISA por meio da Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

4.3.2 Seletividade e efeito matriz

A seletividade é a capacidade de o método distinguir a resposta do analito a partir de todas as outras respostas originadas a partir de outros componentes da amostra que representam o efeito matriz (ROKKA; PELTONEN, 2006). A seletividade do método validado foi testada por comparação das CCAS e CCEMBF (FIGURA 4-13; FIGURA 4-14; FIGURA 4-15; FIGURA 4-16).

Para LAS, SAL e NAR o efeito matriz pode ser verificado pela diminuição da inclinação (*slope*) da CCEMBF em relação à CCAS. Para MON ocorreu efeito contrário, a CCEMBF apresentou menor inclinação do que a CCAS. O efeito da matriz avaliado refere-se apenas a supressão de ionização provocada pelos componentes da amostra para LAS, SAL e NAR, já para a MON houve um ganho de ionização por eletrospray devido a esses componentes.

Por meio da comparação entre a inclinação da CCMBF e da CCEMBF é possível verificar outro tipo de efeito matriz, provocado pela perda de recuperação proveniente das etapas de extração e/ou evaporação do método (SPISSO et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos (**FIGURA 4-13**; **FIGURA 4-14**; **FIGURA 4-15**; **FIGURA 4-16**) a inclinação da CCMBF é muito próxima da inclinação CCEMBF, quase ocorre uma sobreposição dos dois tipos de curva para todas as moléculas em estudo. Isso demonstra que o método de extração/evaporação promove pouca perda de recuperação, o que o torna apropriado para análises quantitativas.

O MAPA estabelece que o estudo de efeito matriz não necessita ser realizado no caso de se utilizar CCMBF ou CCEMBF. No entanto, é importante levar em consideração as perdas de recuperação provenientes das etapas de extração, mesmo que ocorram em menores proporções. Assim, devido a essas diferenças de recuperação e por razões práticas, foi utilizada CCMBF para a quantificação de todos os coccidiostáticos.

4.3.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o cálculo do LD e do LQ instrumental e experimental (**item 3.2.3.4**), foram utilizadas equações das CCAS e CCMBF, respectivamente (**TABELA 4-4**; **TABELA 4-5**). O LD e LQ instrumentais são calculados para verificar a sensibilidade do equipamento em detectar e quantificar os analitos em solução sem as interferências dos componentes da matriz. Já o LD e LQ experimentais levam em consideração a resposta do equipamento frente à presença de interferentes provenientes da matriz. A intensão do cálculo desses dois tipos de LD e LQ é justamente comparar a resposta do equipamento na presença e ausência de componentes da matriz que podem interferir nos processos de detecção e quantificação.

TABELA 4-4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) Instrumentais

	Curva	Coefficiente Linear	Coefficiente Angular	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Lasalocida	1	0,0033	0,0217	0,0-40,0	0,9	2,8
	2	0,0080	0,0239			
	3	-0,0045	0,0228			
Monensina	1	0,0012	0,0225	0,0-20,0	0,3	0,8
	2	0,0040	0,0221			
	3	0,0008	0,0226			
Salinomicina	1	0,0544	0,0257	0,0-200,0	3,3	10,1
	2	0,0721	0,0263			
	3	0,0206	0,0261			
Narasina	1	0,0149	0,0575	0,0-30,0	0,5	1,4
	2	0,0209	0,0591			
	3	0,0045	0,0579			

TABELA 4-5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) Experimentais

	Curva	Coefficiente Linear	Coefficiente Angular	Faixa ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Lasalocida	1	0,0002	0,0123	0,0-40,0	1,3	3,8
	2	0,0006	0,0050			
	3	0,0052	0,0045			
Monensina	1	0,0056	0,0438	0,0-20,0	0,3	0,8
	2	0,0029	0,0175			
	3	0,0069	0,0163			
Salinomicina	1	0,0088	0,0169	0,0-200,0	2,0	6,1
	2	0,0191	0,0061			
	3	0,0187	0,0059			
Narasina	1	-0,0205	0,0530	0,0-30,0	1,5	4,6
	2	0,0181	0,0336			
	3	0,0030	0,0405			

De acordo com os resultados obtidos (TABELA 4-4, TABELA 4-5), o LD e LQ instrumentais para LAS, SAL e NAR são menores em relação aos LDs e LQs experimentais. Isto ocorre devido à inclinação da CCMBF ser menor em relação à inclinação da CCAS, representando diminuição da sensibilidade. Para MON, apesar da inclinação da CCAS ser menor em relação à inclinação da CCMBF, os LD e LQ instrumentais e experimentais são iguais, consequentemente em virtude da razão com quocientes e denominadores muito próximos.

4.3.4 Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade Intralaboratorial)

Precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (MAPA/ACS, 2011). Pode ser avaliada por meio da repetitividade, da reprodutibilidade intralaboratorial e da reprodutibilidade interlaboratorial. Nesse estudo foram avaliadas a repetitividade e a reprodutibilidade intralaboratorial expressas pelo coeficiente de variação (CV) em porcentagem.

A repetitividade é a precisão intracorrida, pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição (MAPA/ACS, 2011). O MAPA estabelece os valores de CV aceitos para o estudo de repetitividade de acordo com a faixa de concentração dos analitos (TABELA 4-6). Assim, de acordo com os valores de CV encontrados (TABELA 4-7) para cada concentração de cada antibiótico ionóforo todos estão abaixo daqueles definidos pelo MAPA.

TABELA 4-6. CV (%) definidos pelo MAPA para cada faixa de concentração

<i>Faixa de Concentração (C)</i>	<i>Coeficiente de Variação – CV (%)*</i>	
	Repetitividade	Reprodutibilidade Intralaboratorial
$1,0 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$	20,0	30,0
$10,0 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 100,0 \mu\text{g kg}^{-1}$	13,3	20,0
$100,0 \mu\text{g kg}^{-1} \leq C < 1,0 \text{mg kg}^{-1}$	10,0	15,0

*Adaptado MAPA/AC (2011)

TABELA 4-7. Precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) e Recuperação do método de determinação de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR em peito de frango liofilizado.

	Concentração Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Precisão							
		Repetitividade						Reprodutibilidade Intralaboratorial (n = 18)	
		Dia 1 (n = 6)		Dia 2 (n = 6)		Dia 3 (n = 6)			
		CV (%)	Rec (%)	CV(%)	Rec (%)	CV(%)	Rec (%)	CV(%)	Rec (%)
LAS	10,0	8,3	82,5	6,4	108,4	6,3	83,6	15,2	91,5
	20,0	5,0	86,3	3,8	104,7	4,9	84,7	10,9	91,9
	30,0	7,0	88,3	4,2	104,9	7,6	97,5	9,4	96,9
MON	5,0	8,1	88,8	6,0	107,2	6,8	80,9	14,3	92,3
	10,0	7,4	90,8	9,8	107,7	7,2	87,7	11,6	95,4
	15,0	8,5	84,8	0,8	109,7	8,4	102,7	13,2	99,1
SAL	50,0	8,2	87,6	6,0	107,7	6,5	85,7	12,2	93,5
	100,0	5,3	87,7	5,2	107,3	4,0	91,0	9,8	95,3
	150,0	4,9	88,2	4,7	105,6	7,6	95,6	9,2	96,4
NAR	7,5	6,5	92,1	8,2	96,2	4,5	100,5	7,4	96,3
	15,0	5,6	93,5	4,2	96,4	3,9	93,5	4,7	94,5
	22,5	5,1	92,7	3,6	101,5	2,7	95,3	4,5	96,5

A reprodutibilidade intralaboratorial refere-se à precisão intermediária avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tal como o dia de análise (MAPA/ACS, 2011). Os valores encontrados para a reprodutibilidade intralaboratorial (TABELA 4-7) são menores do que aqueles estipulados pelo MAPA (TABELA 4-6). Dessa forma, em termos de precisão o método desenvolvido encontra-se validado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo MAPA.

4.3.5 Recuperação

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como *clean up*, diluições ou pré-concentrações, derivatizações, secagens (MAPA/ACS, 2011).

O MAPA estabelece a faixa de recuperação aceita de acordo com as concentrações dos analitos (**TABELA 4-8**).

TABELA 4-8. Faixas de Recuperação (%) aceitas pelo MAPA para valores acima e abaixo de 100% a partir de uma determinada concentração.

<i>Faixa de Concentração (C)</i>	<i>Intervalos (%)</i>
$C \leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50 % a +20 %
$1 \mu\text{g kg}^{-1} < C < 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30 % a +10 %
$C \geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20 % a +10 %

*Adaptado de MAPA/ACS (2011).

De acordo com os resultados encontrados (**TABELA 4-7**), todos os antibióticos apresentaram recuperação dentro da faixa estipulada, tanto para as análises realizadas no mesmo dia, quanto para a recuperação média referente aos três dias de estudo. Para todos os antibióticos ionóforos a recuperação média referente aos três dias de estudo apresentou valores superiores a 90%, indicando que o método apresenta baixas perdas durante o processo de extração e evaporação.

4.3.6 Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

$CC\alpha$ é o limite em que pode ser decidido se uma amostra é não conforme de acordo com uma probabilidade de erro α (ROKKA; PELTONEN, 2006). Para substâncias permitidas como LAS, MON, SAL e NAR, $\alpha = 5\%$, enquanto para substâncias banidas $\alpha = 1\%$ (MAPA/ACS, 2011). $CC\beta$ é a concentração mais baixa de um analito que pode ser detectada, identificada e quantificada numa amostra, com uma probabilidade de erro β (ROKKA; PELTONEN, 2006). Tanto para substâncias permitidas quanto para substâncias banidas $\beta = 5\%$ (MAPA/ACS, 2011).

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram calculados a partir dos resultados de reprodutibilidade intralaboratorial (**TABELA 4-7**), sendo utilizadas 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR de cada antibiótico. No peito de frango liofilizado, os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ variaram de $11,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $115,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $13,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $130,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (**TABELA 4-9**). Para todos os antibióticos os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ determinados foram maiores do que seus respectivos LMRs.

TABELA 4-9. Limite de Decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de Detecção ($CC\beta$)

	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Lasalocida	23,3	26,5
Monensina	11,8	13,6
Salinomicina	115,2	130,3
Narasina	16,1	17,2

De acordo com o MAPA, os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ são sempre maiores que o LMR, porém devem ser o mais próximo possível de seu valor. Para todos os antibióticos o valor de $CC\alpha$ é ligeiramente próximo ao LMR, verificando concordância com as diretrizes seguidas. O MAPA também estabelece que o $CC\beta$ não deve ultrapassar mais de duas vezes o valor em fração da unidade do CV da **TABELA 4-6**, conforme a faixa de concentração do analito, multiplicado pelo LMR (**Equação 7**). Os valores de $CC\beta$ determinados para os antibióticos LAS, MON, SAL e NAR estão em acordo com a diretriz estabelecida pelo MAPA para o aceite de seus valores.

(7)

$$CC\beta \leq \left(1 + 2 \times \frac{CV(Tabela\ 2.8)}{100} \right) \times LMR$$

4.3.7 Robustez

De acordo com o MAPA, o estudo de robustez deve ser realizado demonstrando a estabilidade do método sob diferentes condições, no entanto não especifica as condições que devem ser alteradas. Nesse sentido, como uma proposta de avaliação de robustez do método proposto, foram variadas a vazão da fase móvel, a temperatura da coluna e o lote da coluna cromatográfica. Os resultados da robustez para o método desenvolvido estão apresentados na **TABELA 4-10**. Mesmo com todas as variações das condições analíticas, os valores de concentração não apresentaram variações significativas quando comparadas àquelas do método original. Dessa forma, o método analítico foi considerado robusto e apropriado para a aplicação em análises de rotina.

TABELA 4-10. Condições cromatográficas e valores encontrados durante estudo de robustez

Parâmetros	Variações	[LAS] µg kg ⁻¹	(%)*	[MON] µg kg ⁻¹	(%)*	[SAL] µg kg ⁻¹	(%)*	[NAR] µg kg ⁻¹	(%)*
Vazão (µL min ⁻¹)	845	16,2	80,9	9,4	93,5	96,0	96,0	14,9	99,3
	850	17,3	86,5	9,1	91,0	87,7	87,7	14,0	93,3
	855	18,0	90,0	9,2	91,8	88,0	88,0	13,9	92,7
Coluna	C18 - 2	19,0	95,0	9,9	99,3	97,0	97,0	13,8	92,3
	C18 - 1	17,3	86,5	9,1	91,0	87,7	87,7	14,0	93,3
	C18 - 3	19,8	99,0	9,6	96,2	93,5	93,5	15,0	100,2
Temperatura da Coluna (°C)	39	16,9	84,5	9,0	90,1	89,2	89,2	14,2	94,7
	40	17,3	86,5	9,1	91,0	87,7	87,7	14,0	93,3
	41	16,9	84,5	8,8	88,0	91,0	91,0	14,3	95,3

*(%) encontrada em relação a concentração nominal correspondente ao LMR de cada antibiótico em análise, correspondente a média de seis réplicas.

4.4 Aplicação do Método

O método desenvolvido e validado foi aplicado em 18 amostras adquiridas comercialmente em supermercados de Ribeirão Preto, SP. Foram analisadas seis marcas de abrangência nacional, denominadas de 1, 2, 3, 4, 5 e 6. De cada marca foram analisados três lotes, chamados de A, B e C. A **TABELA 4-11** apresenta a ocorrência e os níveis de resíduos de antibióticos nessas amostras.

Todos os lotes da Marca 1 e 6 apresentaram resíduos de LAS com concentração abaixo do LD experimental, as demais marcas não apresentaram resíduos, uma vez que não houve detecção. Foram encontrados resíduos de MON com concentração abaixo do LD experimental para todas as marcas. Resíduos de SAL com concentração abaixo do LD experimental foram encontrados no lote A da Marca 1 e lote A da Marca 6. Também foram detectados resíduos de NAR em todas as marcas, porém somente o lote A da Marca 2 e apresentou resíduo com concentração acima do LD experimental.

TABELA 4-11. Concentração de resíduos de LAS, MON, SAL e NAR em amostra reais.

		LAS	MON	SAL	NAR
	Lote	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Marca 1	A	0,75 ± 0,20	0,03 ± 0,01	0,20 ± 0,04	1,02 ± 0,59
	B	0,60 ± 0,07	0,04 ± 0,02	-	1,09 ± 0,14
	C	0,63 ± 0,13	0,05 ± 0,00	-	0,95 ± 0,05
Marca 2	A	-	-	-	2,52 ± 2,74
	B	-	0,03 ± 0,02	-	1,13 ± 0,34
	C	-	-	-	0,92 ± 0,00
Marca 3	A	-	0,03 ± 0,00	-	0,98 ± 0,01
	B	-	0,03 ± 0,01	-	0,90 ± 0,01
	C	-	0,04 ± 0,01	-	1,00 ± 0,14
Marca 4	A	-	0,02 ± 0,00	-	0,88 ± 0,08
	B	-	-	-	0,83 ± 0,01
	C	-	0,04 ± 0,02	-	0,83 ± 0,01
Marca 5	A	-	0,02 ± 0,00	-	0,94 ± 0,07
	B	-	0,02 ± 0,00	-	0,95 ± 0,06
	C	-	0,02 ± 0,00	-	0,98 ± 0,17
Marca 6	A	0,44 ± 0,25	0,07 ± 0,07	0,17 ± 0,01	0,91 ± 0,02
	B	0,66 ± 0,19	0,13 ± 0,18	-	0,98 ± 0,13
	C	0,74 ± 0,12	0,14 ± 0,00	-	1,20 ± 0,32

Dessa forma, de todas as concentrações encontradas para cada antibiótico merecem destaque aquelas que apresentam valores superiores ao LD experimental. No caso, somente os resíduos de NAR no lote A da Marca 2 apresentaram concentrações superiores ao LD Experimental de $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os demais antibióticos apresentaram resíduos com concentração abaixo do LD Experimental correspondente, sendo, portanto desconsiderados.

De acordo com o cromatograma da análise da amostra do lote A da Marca 2 (**FIGURA 4-18**), é possível verificar um pico no canal de transição da NAR, o que não é visto na cromatograma do branco da amostra (**FIGURA 4-17**). Assim, pode-se dizer que de todas as amostras analisadas somente NAR apresentou resíduos com concentração detectável, visto a presença de um pico cromatográfico, o que não aconteceu para as outras amostras. Apesar de detectável, a concentração de NAR na amostra foi de $2,52 \mu\text{g kg}^{-1}$ com DP de 2,74, um erro considerável para o valor encontrado. Mesmo assim, o valor encontrado está abaixo do LMR, o qual é $15 \mu\text{g kg}^{-1}$.

FIGURA 4-17. Cromatograma de uma amostra isenta de resíduos de antibióticos ionóforos (branco analítico)

FIGURA 4-18. Cromatograma de uma amostra real contendo NIG (padrão interno) na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e resíduo de NAR

5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um método de separação e detecção de cinco antibióticos ionóforos por LC-ESI-MS/MS. O método conta com um procedimento de preparo de amostra simples e com vantagem de não utilizar técnicas de extração muito laboriosas. Inúmeros protocolos previamente publicados para a determinação de LAS, MON, SAL e NAR em tecidos de frango e ovos foram avaliados no intuito de obter um procedimento com maior simplicidade para o preparo de amostra. Após os estudos de validação, o método foi aplicado em amostras comerciais de peito de frango. Para LAS, MON e SAL foram observadas em concentrações abaixo do LD Experimental. Em um lote de uma determinada marca analisada foi detectado resíduo de NAR em concentração superior ao seu LD Experimental de $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esse valor encontrado não representa um risco à saúde do consumidor, pois se encontra muito abaixo de seu LMR de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$. De uma forma geral, pode-se dizer que as amostras analisadas estão isentas de resíduos de LAS, MON, SAL e até mesmo NAR. Apesar de termos obtido resultados satisfatórios para validação do método proposto seguindo as exigências do MAPA e de outras agências nacionais e internacionais, seria preciso verificar se o método proposto é realmente capaz de extrair resíduos de amostras reais e não apenas em amostras fortificadas em laboratório. Para isso seria necessária a sua aplicação em um material de referência certificado contendo estes antibióticos em concentração conhecida. Na ausência de material de referência, uma outra alternativa seria alimentar frangos com rações contendo estes compostos e analisar os tecidos dos animais por dois métodos diferentes. Cabe também ressaltar que os antibióticos sofrem metabolização, assim há chances de serem encontrados os seus metabólitos e não a sua forma molecular, o que também acarretaria em um falso negativo, sendo necessário um estudo mais aprofundado de seus metabólitos. Finalmente, espera-se que este trabalho possa dar início a questionamentos sobre uma área carente de pesquisas em nosso país, tanto em relação à utilização de antibióticos na criação de aves destinadas ao consumo quanto à aplicabilidade de métodos analíticos para a determinação de resíduos em tecidos animais.

6 REFERÊNCIAS

ASUKABE, H.; MURATA, H.; HARADA, K.; SUZUKI, M.; OKA, H.; IKAI, Y. Basic study on high-performance liquid chromatography determination of four polyether antibiotics pre-derivatized with 1-bromoacetylpyrene. **Journal of Chromatography A**, v. 657, p. 349-356, 1993.

ASUKABE, H.; MURATA, H.; HARADA, K.; SUZUKI, M.; OKA, H.; IKAI, Y. Simultaneous determination of three polyether antibiotics in feeds using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 42, p. 112-117, 1994.

BLASCO, C.; DI CORCIA, A.; PICÓ, Y. Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 116, p. 1005-1112, 2009.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Aves**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Programa Nacional de Controle de Resíduos Contaminantes de Origem Animal (PNCR/Animal)**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 11 mar. 2014.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Aditivos Autorizados**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTACIMENTO (MAPA). **Secretaria de Defesa Agropecuária, Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes: Anexo I Subprogramas de Monitoramento de Controle de Resíduos e Contaminantes**. Brasília, DF, Instrução Normativa Nº17, de 29 de maio de 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Secretaria de Defesa Agropecuária: Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília, DF, MAPA, 2011, 227 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Anexo: Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. Brasília, DF, Resolução - RDC Nº 53, de 2 de outubro 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Brasília, DF, Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa Nacional de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>>. Acesso em 10 mar. 2014.

CARRETERO, V.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 162-173, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. **International Food Standards**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

CODEX ALIMENTARIUS. **Veterinary Drug Residues in Food**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/index.html>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

DI CORCIA, A.; NAZZARI, M. Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 53-89, 2002.

EUROPEAN UNION. **European Medicine Agency: Veterinary Regulatory - Maximum residue limit reports.** Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&mid=WC0b01ac058006488e>. Acesso em: 22 mar. 2014.

EUROPEAN UNION, COMMISSION REGULATION N° 37/2010 of 22 December 2009. **On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.**

FEDENIUK, R. W.; SHAND, P. Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 3-15, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Residues of some veterinary drugs in foods and animals.** Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/en/>. Acesso em: 22 mar. 2014.

GALARINI, R.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; PETTINACCI, L.; DUSI, G. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. **Analytica Chimica Acta**, v. 700, p. 167-176, 2011.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 24, n. 7, 2005.

HOSHINO, Y.; HORIE, M.; NOSE, N.; IWASAKI, H. Determination of monensin in chicken meat by high performance liquid chromatography. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, 1985.

IGLESIAS, A.; NEBOT, C.; VÁZQUEZ, B. I.; MIRANDA, J. M.; ABUÍN, C. M. F.; CEPEDA, A. Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. **Environmental Science Pollutant Residues**, v. 21, p. 2367-2377, 2014.

INOUE, K.; MIURA, Y.; SUZUKI, M.; KISHIKAWA, N.; TOMOAKI, H.; KURODA, N.; OKA, H. Simultaneous determination of five polyether ionophores using liquid chromatography with one-step fluorescent derivatization. **Analytical Sciences**, v. 28, p. 175-178, 2012.

JIMÉNEZ, V.; COMPAYÓ, R.; GUITERAS, J. Analysis of quinolone antibiotics in eggs: preparation and characterization of a raw material for method validation and quality control. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1682–1690, 2012.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 66-79, 2008.

KAYKATY, M.; WEISS, G. Lasalocid determination in animal blood by high-performance liquid chromatography fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 31, p. 81-84, 1983.

KIM, E.; KYEONGNYEO, B.; KANG, E.; KIM, M. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1063-1070, 2012.

KIM, Y. H.; YOO, J. S.; LEE, C. H.; GOO, Y. M.; KIM, M. S. Application of fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry to the structural elucidation of O-demethylabierixin and related polyether antibiotics. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, p. 855-860, 1996.

KOOLS, S. A. E.; MOLTSMANN, J. F.; KNACKER, T. Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 59-65, 2008.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUNTON, J. A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. **Analyst**, v. 126, p. 1630-1632, 2001.

LOPES, N. P.; GATES, P. J.; WILKINS, P. G.; STAUTON, J. Fragmentation studies on lasalocid acid by accurate mass electrospray mass spectrometry. **Analyst**, v. 127, p. 1224-1227, 2002. (A)

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUTON, J. Fragmentation studies on monensin A and B by accurate-mas electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 16, p. 414-420, 2002. (B)

LOPES, R. P.; PASSOS, E. E. F.; ALKIMIM FILHO, J. F.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, D. V.; AUGUSTI, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 28, p. 192-198, 2012. (A)

LOPES, R. P.; REYES, R. C.; GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, p. 201-208, 2012. (B)

MARTINEZ, J. L. Enviromental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Enviromental Pollution**, v. 157, p. 2893-2902, 2009.

MARTÍNEEZ-VILLALBA, A.; MOYANO, E.; GÁLGERAN, M. T. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1255-1263, 2009.

MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I. D. A rapid method for the determination of lasalocid in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by LC-MS-MS. **Analyst**, v. 125, p. 2196-2200, 200.

MATABUDUL, D. K.; CROSBY, N. T.; LUMLEY, I.; SUMARA, S. The optimization of a rapid method for the determination of lasalocid in poultry feed using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 75, p. 465-471, 2001.

MATABUDUL, D. K.; LUMLEY, I. D.; POINTS, J. S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal

livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analyst**, v. 127, p. 760-768, 2002.

MIAO, X. S.; MARCH, R. E.; METCALFE, C. D. Fragmentation study of salinomycin and monensin A antibiotics using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 149-154, 2003.

MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; DELAHAUT, P. Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, p. 27-37, 2003.

MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; VAN PETEGHEM, C. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 533-539, 2005.

NEBOT, C.; IGLESIAS, A.; REGAL, P.; MIRANDA, J.; CEPEDA, A.; FENTE, C. Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 78-85, 2012.

NIESSEN, W. M. A. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 812, p. 53-75, 1998.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 683-702, 2005.

NOMURA, C. S.; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova**, vol. 31, p. 104-113, 2008.

OLEJNIK, M.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; JEDZINIAK, P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8141-8148, 2009.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

ROBERT, C.; GILLARD, N.; BRASSEUR, P. Y.; PIERRET, G.; RALET, N.; DUBOIS, M.; DELAHAUT, P. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, vol. 30, p. 443-457, 2013.

ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 470-478, 2006.

SASSMAN, S. A.; LEE, L. S. Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: monensin and lasalocid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1614-1621, 2007.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ (SESA). **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte no estado do Paraná**. Curitiba: SESA/ISEP, 2005.

SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. A.; COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; NÓBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray Ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, p. 82-92, 2010. (A)

SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. **Food Additives and Contaminants: Part B**, vol. 3, p. 212-219, 2010. (B)

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **História da avicultura no Brasil**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 10 mar. 2014.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório Anual 2013**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes?m=75&date=2013-06>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

UNION OF CONCERNED SICENTISTS – UCS. **Hogging it**: Estimate of antimicrobial abuse in livestock. Cambridge: UCS, 2001. Disponível em: <<http://www.ucsusa.org/publications/>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Agricultural Research Service: National Nutrient Database for Standard Reference Release 26. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, p. 1875-1887, 2011.

VOLMER, D. A.; LOCK, C. M. Electrospray ionization and collision-induced dissociation of antibiotic polyether ionophores. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 12, p. 157-164, 1998.

WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 81-86, 2006.