



ANTICOCCIDIANOS IONÓFOROS POLIÉTEROS EM OVOS: METODOLOGIAS ANALÍTICAS E OCORRÊNCIA NO BRASIL



Rosana Gomes Ferreira*, Bernardete Ferraz Spisso, Marlene Ulberg Pereira, Mychelle Alves Monteiro, Rafaela Pinto da Costa

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS): Av. Brasil, 4365 – Manginhos – Rio de Janeiro - RJ CEP 21040-360.

*Autor para correspondência – rosana.ferreira@incqs.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

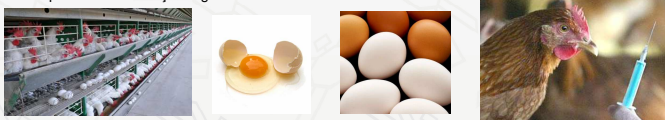
A coccidiose é uma doença de grande importância veterinária, que atinge tanto animais mamíferos quanto aves, causada por protozoários do gênero *Eimeria*¹. Os ionóforos poliéteres (IP) são usados na prevenção da coccidiose em frangos de corte e frangas de reposição, mas não em aves de postura². A presença de resíduos dessas substâncias em ovos ocorre então através da contaminação (não intencional) em rações destinadas a poedeiras comerciais³.

Com relação aos riscos para a saúde humana relacionados ao consumo de alimentos contendo estes resíduos, cada cocciostático tem um perfil toxicológico individual, e como a maioria dos cocciostáticos licenciados nunca foi autorizada para utilização em animais não alvo, o banco de dados disponíveis para a avaliação de efeitos adversos para a saúde é muito limitado, confinado principalmente a relatos de intoxicações de animais de fazenda e alguns estudos de tolerância, muitas vezes sem uma descrição completa da concepção experimental e da taxa de exposição⁴.

Objetivando o controle e a vigilância dos resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, o MAPA criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCR/Animal), instituído pela Instrução Normativa SDA Nº 42 de 20/12/1999, e a ANVISA criou o Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários (PAMVet), instituído oficialmente pela RDC Nº 253 de 16/09/2003.

O último relatório disponível do PAMVet recomenda delinear a nova matriz ovo, com a definição das moléculas a analisar, validação dos métodos analíticos e treinamento de laboratórios⁵, porém nenhum dado sobre o monitoramento de anticoccidianos em ovos foi divulgado pela ANVISA.

O PNCR/Animal é composto pelos seus programas setoriais, dentre eles, o PNCR/Ovos. Recentemente, foi publicada a Instrução Normativa SDA Nº 17, de 29/05/2013, que aprovou o escopo analítico para o monitoramento dos produtos de origem animal nesse ano incluindo os analitos lasalocida (LAS), maduramicina (MAD), monensina (MON), narasin (NAR), salinomina (SAL) e senduramicina (SEN), do grupo dos anticoccidianos IP no subprograma PNCR/Ovos, adotando o valor de 10 µg Kg⁻¹ como limite de referência para tomada de ação regulatória.



OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é fazer uma avaliação das metodologias analíticas publicadas para determinação de anticoccidianos IP em ovos e verificar a ocorrência destes resíduos nesta matriz no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Artigos e documentos sobre ocorrência e metodologias analíticas para determinação de resíduos de anticoccidianos IP em ovos publicadas a partir do ano 2000 foram pesquisadas na base Science Direct utilizando-se os termos "anticoxidantes", "cocciostats", "eggs", "occurrence" and "monitoring".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados das metodologias analíticas das publicações identificadas foram avaliados e resumidos na Tabela 1. Das 15 publicações estudadas, 8 utilizaram a técnica de extração por fase sólida (SPE) e a maioria das metodologias empregou acetonitrila (ACN) como solvente de extração.

Avaliando-se as técnicas utilizadas para identificação e quantificação dos analitos nas metodologias analíticas estudadas, observou-se que todas utilizaram cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) com ionização por eletrospray (ESI) e monitoramento de reações múltiplas (MRM), com exceção de uma metodologia em que foi usada a técnica de fluorimunoensaio por tempo resolvido competitivo. A técnica de LC-MS/MS possui a vantagem de ser mais específica e seletiva, além de permitir a execução de ensaios de múltiplos-resíduos, enquanto a técnica de fluorimunoensaio apresentada foi destinada apenas para um único analito.

Todas as metodologias apresentadas estão adequadas para atender aos Limites de Referência adotados pelo MAPA (10 µg Kg⁻¹), exceto para o analito LAS, pois algumas metodologias foram desenvolvidas baseadas no Limite Máximo de Resíduo adotado pela União Européia (UE), que é de 150 µg Kg⁻¹ para LAS⁶ e nos Níveis Máximos ou tolerâncias, também estabelecidos pela UE, que são 2 µg Kg⁻¹ para MAD, MON, NAR e SEN e 3 µg Kg⁻¹ para SAL⁷.

Foram publicados os resultados das análises de ovos realizadas pelo PNCR/Animal em 2011 e 2012, através da Instrução Normativa Nº 7, de 4/04/2012 e Instrução Normativa Nº 07, de 27/03/2013, respectivamente, mostrando que 100% das amostras analisadas nesses dois anos, 31 em 2011 e 60 em 2012 para LAS e 43 para os demais analitos em 2012, estavam conformes.

Em 2010, um estudo sobre a ocorrência de resíduos de antibióticos em ovos, coletados no município do Rio de Janeiro, realizou a análise de anticoccidianos IP em 100 amostras empregando uma metodologia baseada na extração com solvente e determinação pela técnica de LC-MS/MS desenvolvida e validada pelo Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do INCQS/Fiocruz. Foram encontrados resíduos de MAD, MON, NAR, SAL e SEN em, respectivamente, 1%, 3%, 5%, 21% e 4% do total de amostras analisadas, com 2% de amostras não conformes para SAL de acordo com os valores preconizados pela UE⁸.

CONCLUSÃO

As metodologias analíticas estudadas apresentaram métodos de extração de fácil execução que podem ser facilmente aplicados. A técnica de LC-MS/MS foi apresentada pela maioria dos métodos estudados para identificação e quantificação dos analitos, o que evidencia que, apesar de seu elevado custo, está se tornando uma técnica bastante comum entre os laboratórios. As metodologias para avaliação da ocorrência de resíduos de anticoccidianos IP em ovos devem-se adequar aos atuais limites adotados a fim de verificar a conformidade das amostras. O levantamento bibliográfico demonstrou escassez de dados sobre a avaliação da ocorrência de anticoccidianos IP em ovos no Brasil, evidenciando a necessidade de mais estudos nesta área.

REFERÊNCIAS

- Netto JVP. Antibióticos e Quimioterápicos em Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Atheneu; 1989.
- Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas autorizados (atualização 03/12/2008). [acesso em 23 jun 2013]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados>.
- Mazocco H. Resíduos contaminantes em ovos comerciais. *Avicultura Industrial*; 2006;1:12-20.
- Dorne JLCM, Fernández-Cruz ML, Bertelsen U, Renshaw DW, Peltonen K, Anadon A, Feil A, Sanders P, West P, Fink-Gremmlis J. Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013; 270:196-280.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Relatório de 2006 - 2007. Monitoramento de resíduos em leite expostos ao consumo (5° e 6° ano de produção). Brasília (DF): Anvisa; 2009. [Internet] 2013 [acesso em 23 jun 2013]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43bc4c6735/PAMVet.pdf?MOD=AJPERES>.
- União Européia Comissão Europeia. Regulamento (EU) nº 37/2010, de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia* n. L 15, 20 janeiro 2010, p. 1-70. [acesso em 23 jun 2013]. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/lex/lexendres/vol5/reg_2010_37/reg_2010_37_pt.pdf.
- União Européia Comissão Europeia. Regulamento (CE) nº 127/2009, de 10 fevereiro 2009. Define níveis máximos para a presença de cocciostáticos ou histomonostáticos em gêneros alimentícios resultante da contaminação cruzada inevitável destas substâncias em alimentos não destinados para animais. *Jornal Oficial das Comunidades Europeas* nº L40, 11 fevereiro 2009, p. 7-11.
- Spisso BF, Pereira UM, Ferreira RG, Monteiro MA, Costa RP, Cruz TA, Nóbrega AW. 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*. 2010; 3(4):212-219.

Tabela 1 - Metodologias analíticas para determinação de resíduos de anticoccidianos ionóforos poliéteres em ovos

Ionóforos poliéteres	Padrão interno	Tratamento da amostra	Técnica analítica	Recuperação	Detalhes	Referências
MON, LAS, NAR e SAL	---	5 g de amostra, extração com 15 mL de MeOH 87%, centrifugação, purificação do extrato por SPE e adição com 80 µg de MeOH 80%.	LC-MS/MS ESI e MRM.	93% para NAR.	LOD: NAR: 0,04 ng/mL, SAL: 0,04 ng/mL, MON: 0,09 ng/mL, LAS: 0,12 ng/mL.	Rosen J. Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotics in liver and egg by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. <i>Analyst</i> . 2001; 126:1990-1995.
MON, LAS, NAR e SAL	---	5 g de amostra, + 15 g de Na ₂ SO ₄ anidro, extração com 10 mL de MeOH, centrifugação, purificação do extrato por SPE e adição com 5 mL de MeOH, evaporação até 1 mL a 40 °C com N ₂ .	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 2,0 µg/kg: LAS (10%), MON (10%), SAL (102%), NAR (99%), NAR (99%).	LOD: 1 ng/mL para todos os analitos.	Matubaid DK, Conway B, Lamsley, Sumar S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in egg and muscle tissues by tandem electrospray LC-MS/MS. <i>Food Chemistry</i> . 2001; 75: 345-354.
MON, LAS, NAR e SAL	---	5 g de amostra, adição do PI, extração com 10 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de 5 mL do extrato por SPE, evaporação até 1 mL a 40 °C com N ₂ .	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 2,5 µg/kg: LAS (99%), MON (99%), SAL (99%), NAR (99%), NAR (99%), NAR (99%).	LOD: 1 ng/g	Matubaid DK, Lamsley JD, Pianti JS. The determination of 5 antioxiocidants drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). <i>Analyst</i> . 2002; 127: 760-768.
MON, LAS, NAR e SAL	---	2,5 mL de amostra, extração com 7,5 mL de ACN, evaporação do extrato até a secura a 50-55 °C com N ₂ , adição de mais 7,5 mL de ACN e nova evaporação, ressuspenso com 3 mL de hexano, centrifugação, purificação do extrato por SPE e adição com 5-6 mL de MeOH, evaporação do extrato até a secura a 50-55 °C com N ₂ , ressuspenso com 500 µL de MeOH, adição de 500 µL de H ₂ O, agitação e centrifugação, adição de 100 µL de hexano e booster formação de emulsão turva e granosa.	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 100 ppb: LAS (60%), MON (85%), SAL (80%), NAR (80%).	LOD: 1 ppb	Heiler DM, Nuchetti CB. Development of Multichannel Methods for Drug Residues in Eggs: Silica SPE Cleanup and LC-MS/MS Analysis of Ionophore and Macrolide Residues. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2004; 52: 4181-4189.
MON, LAS, NAR, SAL e MAD	DNC-08 ^a , NIG e DCLAZ-bis ^a	5 g de amostra, adição do PI, + 10 g de Na ₂ SO ₄ anidro, extração com 15 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de todo o sobrenadante por SPE, evaporação até a secura a 40 °C com N ₂ e ressuspenso com 300 µL de ACN.	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 2 µg/kg: MON (59%), LAS (80%), NAR (53%), SAL (44%) e MAD (52%).	CC: 0,07 µg/kg para SAL, 0,4 µg/kg para MAD, CC: 0,1 µg/kg para SAL, 0,5 µg/kg para MAD.	Dubois M, Perret G, Delahaut P. Efficient and accurate detection of residues of 10 anticoccidials in egg according to Commission Decision 2002/673/EC. <i>Journal of Chromatography B</i> . 2004; 813: 181-189.
MON, LAS, NAR e SAL	---	10 g de amostra, adição do PI, extração com 10 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação até a secura a 60 °C com N ₂ e ressuspenso com 500 µL de ACN (H ₂ O 90/10, v/v).	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 1 µg/kg: 50 a 120%.	CC: 1 µg/kg para todos os analitos, CC: 1,2 µg/kg para LAS e 1,6 µg/kg para NAR.	Mortier L, Deschere E, Pelletier C. Determination of the ionophore coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. <i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i> 2002; 19: 533-539.
MON, LAS, NAR e SAL	---	5 g de amostra, + 15 g de Na ₂ SO ₄ anidro, extração com 30 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de 5 mL do extrato por SPE, evaporação até a secura a temperatura ambiente com N ₂ e ressuspenso com 200 µL de solução de ACN e acetato de sódio 2 mM contendo 2% de ácido acético (95:5, v/v).	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 2,0 µg/kg: LAS (79%), MON (99%), SAL (99%), NAR (78%).	CC: 0,8 µg/kg para NAR a 1,4 µg/kg para LAS, CC: 0,9 µg/kg para NAR a 2,0 µg/kg para LAS.	Rokka M, Peltonen K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of a LC-MS/MS method. <i>Food Additives and Contaminants</i> , May, 2006; 23 (5): 470-478.
MON	---	1 g de amostra, extração com 4 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação até a secura a temperatura de 65 °C com N ₂ e ressuspenso com 0,5 mL de H ₂ O desmineralizada.	Fluorimunoensaio por tempo resolvido competitivo	102%.	LOD: 2,0 µg/kg, CC: 1,2 µg/kg, CC: <2,0 µg/kg.	Hagen V, Poppo P, Tuomola M, Lyyonen T. Rapid time-resolved fluorimunoassays for the screening of fluoriminoresidues in eggs. <i>Analyst Chem Acta</i> . 2006; 557: 164-168.
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD	DNC-08 ^a , NIG e DCLAZ-bis ^a	2 g de amostra, adição do PI, extração com 8 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação de 5 mL do extrato até a secura a 50 °C com N ₂ , ressuspenso com 500 µL de solução de acetato de sódio 20 mM em LC-MS/MS.	LC-MS/MS ESI e MRM.	Expresso como rendimento para 2 µg/kg: MON (78%), NAR (81%), SEN (32%) e MAD (32%).	CC: 0,71 µg/kg para SAL a 0,9 µg/kg para SEN e 0,4 µg/kg para LAS, CC: 0,52 µg/kg para MAD a 1,38 µg/kg para LAS.	Dubois M, Perret G, Besinot M, Roudard B, Veau E, Sanders P. Validation of a multiresidue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/673/EC. <i>Journal of Chromatography B</i> . 2009; 1126: 8199-8157.
MAD, SAL, MON e LAS	---	5 g de amostra, + de 10 a 15 g de Na ₂ SO ₄ anidro, extração com 20 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação do sobrenadante até a secura a temperatura ambiente com N ₂ e ressuspenso com 1 mL de solução de MeOH.	LC-MS/MS ESI	Para 2,0 µg/kg: MAD (79,5%), SAL (85,2%), MON (110,6%) e LAS (85,2%).	LOQ: 0,1 a 0,2 µg/kg	Shao B, Wu X, Zhang J, Duan H, Chu X, Wu Y. Development and validation of a multiresidue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs and chicken. <i>Chromatographia</i> . 2009; May (No. 9/10): 693-1083-1088.
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD	---	2 g de amostra, adição do PI, extração com 2x 4 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação de 200 µL do extrato até a secura a 46-48 °C com N ₂ , ressuspenso com 1 mL de solução de 5 mM Li ₂ NaOAc:MeOH (70:30, v/v).	LC-MS/MS ESI e MRM.	100,1% para NAR no nível de LMR.	CC: 2,3 µg/kg para MAD, MON, NAR, SEN, 1,4 µg/kg para SAL e 17,2 µg/kg para LAS, CC: 2,5 µg/kg para SEN, 2,7 µg/kg para MAD, MON e NAR, 3,9 µg/kg para SAL e 20,2 µg/kg para LAS.	Spisso BF, Ferreira RG, Pereira ML, Monteiro MA, Cruz TA, Costa RP, Lima AMB, Nóbrega AW. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. <i>Analyst Chem Acta</i> . 2010; 682: 82-92.
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD	DNC-08 ^a , NIG, ROB-d8 ^b e DECOQ-45 ^c	2 g de amostra, adição do PI, extração com 1 mL de ACN, adição de 4g de Na ₂ SO ₄ anidro, agitação e centrifugação, adição de 6 mL de ACN, extração da gordura com 5 mL de n-hexano, centrifugação e decantação da fase orgânica superior, repetição do deslipidamento por mais 2 vezes, purificação do extrato por SPE, evaporação de 5 mL do extrato até a secura a 50 °C com N ₂ , ressuspenso com 1 mL de MeOH, extração com 3 mL de solução de OCM de tempo frio, purificação do extrato por SPE, adição dos analitos com 1 mL de MeOH, evaporação do extrato até a secura a 40 °C com N ₂ , ressuspenso com 1 mL de MeOH.	LC-MS/MS ESI e MRM.	Para 1 µg/kg: MON (413%), NAR (819%), NAR (89,1%), SAL (85,2%), SEN (108%), MAD (108%) e LAS (105%).	CC: 2,2 µg/kg para MON e NAR a 3,3 µg/kg para LAS e 174 µg/kg para LAS, CC: 2,4 µg/kg para MON a 3,7 µg/kg para SAL e 201 µg/kg para LAS.	Galassi R, Fiumi L, Moretti S, Petracca L, Di G. Development and validation of a multiresidue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. <i>Analyst Chem Acta</i> . 2010; 706: 167-176.
NAR	---	10 g de amostra, extração com 6 mL de ACN, agitação e centrifugação, após decantação de 30 min a -20 °C, evaporação dos 6 mL de ACN até a secura a 50 °C com N ₂ , ressuspenso com 1 mL de solução de OCM de tempo frio, purificação do extrato por SPE, adição dos analitos com 1 mL de MeOH, evaporação do extrato até a secura a 40 °C com N ₂ , ressuspenso com 1 mL de MeOH.	LC-MS/MS ESI e MRM.	88,5% para 50 ng/g e 82,4% para 100 ng/g.	LOD: 1,5 ng/g, LOQ: 5 ng/g	Kim E, Baha K, Kang E, Kim M. Quantitative analysis of ionophores and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. <i>Food Chemistry</i> . 2012; 132: 1063-1070.
LAS e MAD	Sulfamer ^a	1g de amostra, adição de 4 mL de solução de MeOH:HO:CH ₃ COOH (80:20,1 v/v), + 0,5g de CH ₃ COONa + 2,0g de Na ₂ SO ₄ anidro, agitação e centrifugação, adição do PI em 1 mL do extrato.	LC-MS/MS ESI e MRM.	41% para LAS a 100 µg/kg e 69% para MAD a 50 µg/kg.	LD: 1,2 µg/kg para LAS e 3,7 µg/kg para MAD, LO: 2,8 µg/kg para LAS e 4,1 µg/kg para MAD, CC: 165 µg/kg para LAS e 170 µg/kg para MAD, CC: 182 µg/kg para LAS e 21,2 µg/kg para MAD.	Caviglioli AL, Cavaliere C, Pavesana S, Sampieri R, Lajani A. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in eggs. <i>Journal of Chromatography A</i> . 2012; 1268: 84-90.
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD	DNC-08 ^a , ROB-d8 ^b e DECOQ-45 ^c	5 g de amostra, adição do PI, extração com 20 mL de ACN, evaporação de 10 mL do extrato até a secura a 60 °C com N ₂ e ressuspenso com 500 µL de ACN:H ₂ O (80:20, v/v).	UPLC-MS/MS ESI e MRM.	MON (81%), LAS (55%), NAR (69%), SAL (81%), SEN (81%) e MAD (62%).	CC: 2,13 µg/kg para SEN a 3,83 µg/kg para LAS a 179 µg/kg para LAS, CC: 2,44 µg/kg para SEN a 4,67 µg/kg para LAS a 209 µg/kg para LAS, LO: 1 µg/kg para LAS.	Mokony M, Clarke L, O'Mahony J, Gadaj A, O'Kennedy R, Dinahar M. Determination of 20 coccidiostats in eggs and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. <i>Journal of Chromatography A</i> . 2012; 1255: 94-103.

Obs.: acetonitrila (ACN), decanoquinol-45 (DECOQ-45), diclazuril (DCLAZ), diminocrotonilamida-8 (DNC-08), lasalocida (LAS), maduramicina (MAD), metanol (MeOH), monensina (MON), acetato de sódio (NaOAc), narasin (NAR), nigericina (NIG), robenidina-8 (ROB-d8), salinomina (SAL), senduramicina (SEN), extração por fase sólida (SPE). ^aPadrões que não são ionóforos polietélicos utilizados porque o método é muito sensível.

