

CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Jair Martins Maria Cavalcante de Melo

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS
DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM MÚSCULO DE FRANGO POR LC-MS/MS**

Rio de Janeiro
2015

Jair Martins Maria Cavalcante de Melo

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS
DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM MÚSCULO DE FRANGO POR LC-MS/MS**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Especialista

Tutora: Bernardete Ferraz Spisso
Preceptora: Mararlene Ulberg Pereira

Rio de Janeiro
2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Melo, Jair Martins Maria Cavalcante de

Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em músculo de frango por LC-MS/MS / Jair Martins Maria Cavalcante de Melo. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

54 f., il.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2015.

Preceptor: Marlene Ulberg Pereira. Tutor: Bernardete Ferraz Spisso

1. Estudos de Validação. 2. Drogas Veterinárias. 3. Ionóforos. 4. Espectrometria de Massas. 5. Galinhas. I. Título

Jair Martins Maria Cavalcante de Melo

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS
DE IONÓFOROS POLIÉTERES EM MÚSCULO DE FRANGO POR LC-MS/MS**

Trabalho de conclusão apresentada ao programa de
Residência Multiprofissional em Saúde na Área de
Vigilância Sanitária com ênfase na Qualidade de
Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Mychelle Alves Monteiro (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Christina Maria Queiroz de Jesus Morais (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Mararlene Ulberg Pereira (Mestre) - Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora) – Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS pela oportunidade de realizar este trabalho.

À MSc Mararlene Ulberg Pereira pela excelente orientação durante todas as etapas deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À Dra Bernardete Ferraz Spisso pela orientação e confiança durante toda a realização deste trabalho de conclusão.

Aos companheiros do Laboratório, Júlia, Rafaela, Leandro, Mychelle e Rosana, pela cooperação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Química que me incentivaram ao longo desse trabalho.

A todos os profissionais da Biblioteca do INCQS/Fiocruz.

Aos meus pais Vera Lúcia e Jair por todo o incentivo.

A todos os amigos que me ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Os ionóforos poliéteres são antibióticos usados para prevenir a coccidiose em frangos de corte, sendo a lasalocida (LAS), monensina (MON), senduramicina (SEN), narasina (NAR), salinomicina (SAL) e a maduramicina (MAD) registradas para essa finalidade no Brasil. Este estudo descreve o desenvolvimento de um método para a determinação de resíduos dos seis ionóforos poliéteres (LAS, MAD, MON, NAR, SAL e SEN) em carne de frango, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). A técnica de ionização empregada foi o eletrospray (ESI) positivo, no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Diferentes experimentos de extração e purificação foram avaliados e o que apresentou os melhores resultados tanto de recuperação quanto de desvio padrão relativo foi o referente à extração com acetonitrila e purificação com o sorvente de Amina Primária e Secundária (PSA), com recuperações entre 60 % e 93 % e desvios padrão relativos entre 3 % e 7 %. O método demonstrou responder de forma linear, nas faixas de concentração estudadas, para todos os analitos. A fim de verificar a aplicabilidade do método foram analisadas 13 amostras de peito de frango de marcas comercializadas no Rio de Janeiro e nenhuma apresentou resíduos de NAR e SEN e 6 foram consideradas contaminadas por LAS, MAD, MON e SAL, mas com concentrações inferiores aos Limites Máximos de Resíduos preconizados tanto pelo *Codex Alimentarius* quanto pela União Europeia. O método proposto poderá ser aplicado em análises de rotina após a validação, permitindo a avaliação da conformidade de amostras de carne de frango e ser disponibilizado para o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet) da Anvisa, contribuindo para ações de vigilância sanitária.

Palavras-chave: Medicamentos veterinários. Resíduos. Ionóforos poliéteres. Frango. LC-MS/MS.

ABSTRACT

Polyether ionophores are antibiotics used to prevent coccidiosis in broiler chickens, with lasalocid (LAS), monensin (MON), senduramicin (SEN), narasin (NAR), salinomycin (SAL) and maduramicin (MAD) being registered for this purpose in Brazil. This study describes the development of a method for determining residues of the six polyether ionophores (LAS, MAD, MON, NAR, SAL and SEN) in poultry meat employing the technique high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The ionization technique was positive electrospray (ESI) in the multiple reaction monitoring acquisition mode (MRM). Different extraction and clean-up experiments were evaluated and the one that presented the best results of both relative standard deviation and recovery was that about extraction with acetonitrile and clean-up with primary secondary amine (PSA) sorbent, with recoveries between 60 % and 93 % and relative standard deviations between 3 % and 7 %. The method was found to be linear in the studied concentration ranges for all analytes. In order to verify the applicability of the method 13 samples of chicken breast of brands marketed in Rio de Janeiro were analyzed and none of them presented NAR and SEN residues and 6 were considered contaminated by LAS, MAD, MON and SAL, but with concentrations below the Maximum Residue Limits recommended by both *Codex Alimentarius* and European Union. The proposed method may be applied in routine analysis after validation, allowing the assessment of conformity of chicken meat samples and made available to the Analyses Program of Veterinary Drug Residues in Food of Animal Origen, (PAMVet) from Anvisa, contributing to health surveillance actions.

Keywords: Veterinary Medicines. Residues. Polyether ionophores. Chicken. LC-MS/MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química dos antibióticos ionóforos poliéteres.....	16
Figura 2	Resumo das técnicas de extração/purificação empregadas.....	42
Figura 3	Cromatogramas de MRM da 1ª transição dos ionóforos poliéteres referentes aos extratos obtidos no experimento 3B nas concentrações dos respectivos LMR para cada substância.....	45
Figura 4	Curvas de calibração para o analito SAL nas três matrizes selecionadas.....	46
Figura 5	Cromatogramas de MRM do analito SAL de uma amostra branca (A), de uma amostra fortificada equivalente a 1 LMR (B) e da amostra 011/2014 (C), com concentração estimada equivalente a 0,06 LMR.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de LMR para músculo de frango estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.....	17
Tabela 2	Resumo das condições analíticas para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em frango por LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS dos métodos indentificados na literatura.....	21
Tabela 3	Programa de eluição do gradiente.....	27
Tabela 4	Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de ionóforos poliéteres.....	28
Tabela 5	Variação aceitável para intensidade relativa das transições alvo na quantificação e confirmação dos analitos na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos concentração equivalente a 1 LMR, com o padrão interno.....	40
Tabela 6	Recuperação do 1º conjunto de experimentos (eficiência do processo de extração/purificação) e RSD.....	43
Tabela 7	Recuperação 2º conjunto de experimentos de (eficiência do processo de extração/purificação) e RSD.....	43
Tabela 8	Coeficientes angulares das curvas de calibração.....	47
Tabela 9	Tabela nutricional dos músculos de frango cru e sem pele.....	47
Tabela 10	Concentrações estimadas de ionóforos poliéteres em 6 amostras de peito de frango.....	48

LISTA DE SIGLAS

ACBR - Amostra Controle Branco Reagentes

ACC - Amostra Controle Conforme

ACN - Acetonitrila

AM - Analisador de Massa

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 - Octadecilsilano

CE - *Collision Energy*

CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CXP - *Collision Exit Potencial*

DP - *Declustering Potential*

EFS - Extração por Fase Sólida

ESI - Eletrospray

FE - Fase Estacionária

FI - Fonte de Ionização

FOA - Ácido Fórmico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IP - Ionóforo Poliéter

LAS - Lasalocida

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

LMR - Limite Máximo de Resíduo

MAD - Maduramicina

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH - Metanol

MMQP - Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MON - Monensina

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas

NaOAC - Acetato de sódio

NAR - Narasina

NIG- Nigericina

PAMVet- Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PAMVet-PR - Programa Estadual do Paraná de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal

PNCRC- Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA-Amina Primária e Secundária

Rec - Recuperação

RSD - Desvio padrão relativo

S/R - razão sinal ruído

SAL- Salinomicina

SEN- Senduramicina

t_R - tempo de retenção

t_{Rrel} - tempo de retenção relativo

UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	IONÓFOROS POLIÉTERES	14
1.2	IONÓFOROS COCCIDIOSTÁTICOS: REGULAMENTAÇÃO E PROGRAMAS DE MONITORAMENTO	16
1.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	18
2	OBJETIVO	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	MATERIAIS	25
3.1.1	Padrões	25
3.1.2	Reagentes e solventes	25
3.1.3	Equipamentos e acessórios	26
3.2	PROCEDIMENTOS	27
3.2.1	Condições cromatográficas e espectrométricas	27
3.2.2	Preparo de soluções	28
3.2.2.1	<i>Soluções padrão estoques</i>	28
3.2.2.2	<i>Soluções padrão intermediárias</i>	28
3.2.2.3	<i>Soluções de padrão interno para fortificação no início do procedimento</i>	29
3.2.2.4	<i>Soluções padrão em metanol:água (1:1 v/v) para fortificação no início do procedimento</i>	29
3.2.2.5	<i>Hexano com acetonitrila</i>	30
3.2.2.6	<i>Solvente de reconstituição (diluyente)</i>	30
3.2.3	Estudo de diferentes procedimentos de extração e purificação (<i>clean-up</i>)	30
3.2.3.1	<i>Primeiro conjunto de experimentos de extração (1A - 4A)</i>	30
3.2.3.2	<i>Segundo conjunto de experimentos de extração (1B - 5B)</i>	30
3.2.3.3	<i>Amostra de frango</i>	31
3.2.3.4	<i>Preparo das amostras para ensaio</i>	31
3.2.3.5	<i>Procedimento de extração</i>	32

3.2.3.5.1	<i>Experimento 1A (Extração direta com Acetonitrila)</i>	32
3.2.3.5.2	<i>Experimento 2A (Extração com adição de Na₂SO₄)</i>	32
3.2.3.5.3	<i>Experimento 3A (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc)</i>	32
3.2.3.5.4	<i>Experimento 4A (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc após a primeira etapa de centrifugação)</i>	33
3.2.3.5.5	<i>Experimento 1B (Extração com ACN:acetato de etila:H₂O (9:2,4:0,6 v/v/v) com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com PSA, C18 e MgSO₄)</i>	33
3.2.3.5.6	<i>Experimento 2B (Extração com ACN com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com PSA, C18 e MgSO₄)</i>	34
3.2.3.5.7	<i>Experimento 3B (Extração com ACN com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com PSA)</i>	34
3.2.3.5.8	<i>Experimento 4B (Extração com ACN com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com C18)</i>	34
3.2.3.5.9	<i>Experimento 5B (Extração com ACN:H₂O e etapa de clean up com C18 e hexano)</i>	35
3.2.3.6	<i>Procedimento de evaporação e ressuspensão</i>	35
3.2.3.7	<i>Sequência de injeção</i>	35
3.2.4	<i>Avaliação da linearidade e do efeito matriz absoluto</i>	36
3.2.4.1	<i>Preparo das amostras para ensaio</i>	36
3.2.4.2	<i>Sequência de injeção</i>	37
3.2.5	<i>Avaliação da aplicabilidade do método em diferentes cortes de músculo de frango – Estudo preliminar</i>	37
3.2.5.1	<i>Sequência de injeção</i>	37
3.2.6	<i>Aplicação do método desenvolvido em amostras de peito de frango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro – Estudo preliminar</i>	38

3.2.6.1	<i>Preparo das amostras</i>	38
3.2.6.2	<i>Preparo da curva de calibração</i>	38
3.2.6.3	<i>Preparo da amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 1 LMR</i>	39
3.2.6.4	<i>Sequência de injeção</i>	39
3.2.6.5	<i>Identificação e quantificação dos analitos</i>	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	ESTUDO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO (<i>CLEAN-UP</i>).....	41
4.2	AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DO EFEITO MATRIZ ABSOLUTO.....	45
4.3	AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DO MÉTODO EM DIFERENTES CORTES DE MÚSCULO DE FRANGO – ESTUDO PRELIMINAR.....	46
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO RIO DE JANEIRO – ESTUDO PRELIMINAR.....	47
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Por ser uma excelente fonte de aminoácidos, minerais e vitaminas do complexo B e ter preços acessíveis para as classes de menor renda, a carne de frango vem conquistando mercado ano a ano, com projeções de crescimento até 2019. Atualmente 70% da produção é destinada ao mercado interno e 30% para a exportação, sendo o Brasil o maior exportador de carne de frango do mundo e o 3º maior produtor, produzindo 12.645.000 toneladas em 2012 (BRASIL, 2014a; UBABEF, 2014).

A seleção genética, a evolução no tratamento e a dieta calculada para satisfazer a demanda corporal melhoraram o ritmo do ganho de peso do animal, mas o uso de hormônios é equivocadamente dito, por 72% dos consumidores brasileiros, como causa do aumento da produção de carne de frango, acreditando que correm o risco de ingerirem essas substâncias. Na realidade, antibióticos e não hormônios são utilizados, e o risco de ingestão de seus resíduos, evidencia a importância das autoridades sanitárias em controlar os produtos que podem ser utilizados, pois a resistência a antibióticos está crescendo, podendo levar à situação de morte por infecções simples (OLIVEIRA; BONFANTI, 2014).

1.1 IONÓFOROS POLIÉTERES

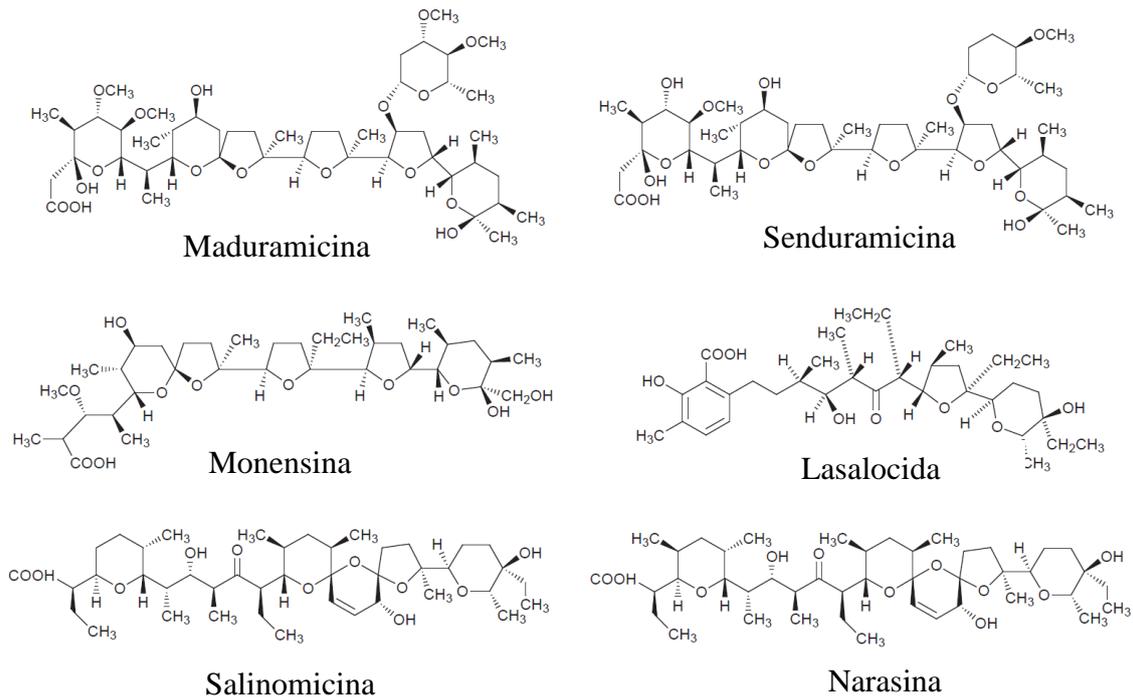
Os ionóforos poliéteres (IP) são antibióticos produzidos por fermentação de *Streptomyces spp* e *Actinomadura spp* sendo usados como aditivos alimentares em frangos, a fim de prevenir a coccidiose, doença causada por protozoários do gênero *Eimeria*, que passam grande parte da vida alojados no trato intestinal dos animais. Por ser comum o uso desses antibióticos na alimentação de frangos, devem ser regulados para que seus resíduos não ultrapassem os limites aceitáveis para a ingestão humana (DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; COMISSÃO EUROPEIA, 2003).

Entre os ionóforos poliéteres autorizados como aditivos antimicrobianos no Brasil na alimentação de aves estão a monensina (MON), a senduramicina (SEN), a lasalocida (LAS), a maduramicina (MAD), a narasina (NAR) e a salinomicina (SAL), que em doses subterapêuticas contribuem para o ganho de peso em frangos (SPISSO, 2010; MOLONEY et al, 2012; BRASIL, 2013). Possuem massa molecular entre 613 e 940 u e suas estruturas incluem grupamentos ácido carboxílico terminal e hidroxila na outra extremidade da cadeia, formando complexos cíclicos com cátions, principalmente o sódio, devido à formação de

pontes de hidrogênios nas suas extremidades. A figura 1 apresenta as estruturas químicas dos ionóforos poliéteres. Por possuírem habilidade de atravessar as membranas biológicas, atuam no transporte de íons na membrana celular, interferindo no gradiente de concentração Na^+/K^+ , no balanço celular normal dos íons, no pH, na peroxidação dos lipídios e na membrana plasmática (DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; PEREIRA, 2013). O seu principal efeito metabólico está na alteração do transporte de íons pela membrana celular agindo de maneira seletiva para bactérias e protozoários (NOVILLA, 2007; HUCZYNSKI, 2012).

Os ionóforos poliéteres são considerados seguros quando usados nas espécies alvos e na dosagem recomendada, sendo tóxicos quando há ingestão excessiva devido a erros na mistura da droga com a ração, engano no cálculo das dosagens, utilização em espécies mais suscetíveis ou devido à associação com drogas que potencializam seus efeitos. As lesões associadas são caracterizadas como degenerativas nos músculos esqueléticos e no miocárdio (PEREIRA, 2013; NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009). A interação com outras substâncias pode potencializar o efeito de vários ionóforos por retardar a sua eliminação pelo animal. O tiamulim, antibiótico diterpeno semi-sintético, retarda a eliminação da salinomicina e causa intoxicação mesmo se ambos os componentes forem utilizados nas dosagens recomendadas. A ingestão de monensina por frangos que receberam tiamulim na água ou por via intramuscular causou sinais de intoxicação como anorexia, diminuição no ganho de peso e aumento nos níveis de aspartato amino transferase, alanina amino transferase e creatinocinase, indicando enfermidade hepática e muscular. O início dos sinais clínicos depende das concentrações dos ionóforos, variando entre 6 a 24 horas e 2 semanas ou mais. Por serem lipídios solúveis e a intensidade dos sintomas ser dose dependente, pode haver uma longa eliminação dos ionóforos ou uma longa reparação tecidual. A intoxicação por ionóforos pode causar morte rápida, em 7 horas ou ter uma evolução crônica com sinais de insuficiência cardíaca congestiva (NOGUEIRA; FRANÇA; PEIXOTO, 2009).

Figura 1- Estrutura química dos antibióticos ionóforos poliéteres



1.2 IONÓFOROS COCCIDIOSTÁTICOS: REGULAMENTAÇÃO E PROGRAMAS DE MONITORAMENTO

De acordo com a lei 9782/99 cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) fiscalizar, entre outros, os alimentos oferecidos ao consumo humano e os resíduos de medicamentos veterinários, de modo a intervir nos prováveis danos ou riscos à saúde da população (BRASIL, 1999). A agência também é responsável por estabelecer no Brasil os Limites Máximos de Resíduos (LMR) de substâncias autorizadas em animais produtores de alimentos, que é a concentração máxima de resíduos permitida legalmente ou que se reconheça como admissível em um alimento (BRASIL, 2001). Estes limites são determinados a partir de estudos toxicológicos que podem ser de curto ou médio prazo e as conclusões são analisadas para que se possa determinar os LMR.

As concentrações dos resíduos de medicamentos veterinários podem variar dependendo do tecido analisado. Em geral, as concentrações são maiores em tecidos de estocagem, como o adiposo, e em órgãos responsáveis pela metabolização e excreção, como o fígado e os rins. Os LMR isolados relativos a diferentes tecidos devem refletir a cinética de depleção dos resíduos nesses tecidos nas espécies animais destinadas ao consumo, sendo necessário um método analítico com limite de quantificação inferior ao LMR e aplicação dos valores de consumo diário humano (COMUNIDADE EUROPEIA, 2001).

Em caso de não haver legislação nacional que referencie o LMR da substância a ser pesquisada, são utilizados os valores harmonizados pelo Mercosul e internalizados pelos países, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas diretivas da União Europeia e os utilizados pela Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) (BRASIL, 2014b). A tabela 1 apresenta os LMR dos IP adotados em músculo de frango por diferentes autoridades regulatórias.

Tabela 1. Valores de LMR para músculo de frango estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Cocciostáticos	Referência	LMR em músculo de frango (µg/Kg)
Lasalocida	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2010)	10
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012)	100
Maduramicina	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2014)	240
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012)	100
	UE (REGULAMENTO DE EXECUÇÃO Nº 388, 19 DE ABRIL DE 2011)	30
Monensina	Codex Alimentarius (COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2012)	10
	Canadá (HEALTH CANADA, 2014).	50
Narasina	Codex Alimentarius (COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2012)	15
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012)	100
	Canadá (HEALTH CANADA, 2014).	50
Salinomicina	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012)	100
	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2010).	5
Senduramicina	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2014)	130
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2012)	50

Uma proposta de ação de vigilância sanitária denominada “Medicamentos Veterinários x Saúde Pública” que possuía entre os objetivos o monitoramento de resíduos em alimentos e da resistência microbiana foi elaborada por um grupo de trabalho (GT) criado pela Anvisa em 2000. Entre as propostas, sugeriu-se a criação do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). O PAMVet foi instituído pela Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003, operacionalizando a competência legal da Anvisa de controlar e fiscalizar os resíduos de medicamentos veterinários (BRASIL, 2014c). Já o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(MAPA), que foi implantado pela Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 de dezembro de 1999, tinha o objetivo de melhorar a produção e a qualidade dos produtos de origem animal ofertados aos brasileiros e ao comércio internacional de alimentos (BRASIL, 2014d).

Os alimentos a serem analisados pelo PAMVet pelo critério de consumo alimentar são: leite bovino, carne de frango, carne suína, pescado, ovo de galinha e mel de abelha. Os medicamentos veterinários selecionados foram aqueles que deixam resíduos nos alimentos, cujos resíduos conferem risco à saúde pública, que apresentam alto potencial de exposição quando utilizados na medicina veterinária e para as quais há metodologia analítica confiável, sensível, prática e de custo acessível para o programa de controle. De acordo com o cronograma, a meta era avaliar carne de frango no segundo ano do programa, mas até o momento essa matriz não foi avaliada. O último relatório, do ano de 2006-2007, 5º e 6º ano de atividades, apresentou os resultados somente sobre a presença de resíduos em leite exposto ao consumo (BRASIL, 2009).

No Paraná, o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, o PAMVet-PR, efetuou em 2005 um levantamento dos principais medicamentos veterinários comercializados para frangos de corte no estado e o resultado mostrou que a fluoroquinolona e os ionóforos eram os mais utilizados (PAMVet-PR, 2005).

Em relação ao subprograma de monitoramento de carne de aves do PNCRC em 2013 foram realizadas análises de 511 amostras para anticoccidianos, encontrando no total 2 não conformidades, ou seja, concentrações acima do limite máximo permitido, no caso para a substância nicarbazina. Nenhuma amostra apresentou resíduos de ionóforos políéteres acima dos LMR adotados pelo MAPA (BRASIL, 2014e).

1.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Atendendo à necessidade de verificação do cumprimento da legislação, métodos analíticos mais eficientes com capacidade de identificar e quantificar analitos em baixas concentrações têm sido desenvolvidos para determinar resíduos de medicamentos veterinários, tais como os ionóforos poliéteres, em alimentos (PASCHOAL et al, 2008).

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários envolve basicamente etapas de extração e de purificação das amostras, a fim de que a menor quantidade de co-

extrativos como ceras, gorduras e pigmentos estejam presentes no extrato final e não interfiram nas análises, contribuindo para a diminuição do efeito matriz, e reduziam a necessidade de manutenção técnica da instrumentação analítica empregada (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

De acordo com Clarke e colaboradores (2014), a extração por solvente, a purificação com partição líquido-líquido e a extração por fase sólida (EFS) são as técnicas de extração mais reportadas nas pesquisas para análises de coccidiostáticos. Os autores escreveram que outros grupos relataram que a cromatografia por imunoafinidade, a extração por fluido supercrítico e a impressão magnética por polímeros moleculares são os procedimentos de isolamento mais reportados nas pesquisas.

A tabela 2 apresenta um resumo de alguns métodos identificados na literatura para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em frango por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). As etapas de extração líquido-líquido e de EFS variaram bastante, utilizando acetonitrila e coluna de sílica, Strata X, que é um sorvente polimérico, e octadecilsilano (C18), que é um sorvente conhecido pela sua habilidade e eficiência em reter um grande número de compostos (MOLONEY et al, 2012; TKÁCIKOVA; KOZAROVA; MATÉ, 2010; TKÁCIKOVA et al, 2012; KIM et al, 2012), metanol e água e coluna de C18 (CHÉNEAU et al, 2007), água com ácido acético e C18 e metanol e a técnica de EFS *online* (CHANG; SU; CHENG, 2013). Dubois, Pierret e Delahaut (2004) e Burnett et al (2012) adicionaram Na₂SO₄ para secagem do extrato e sílica na EFS. Stubbings e Bigwood (2009) apresentaram uma avaliação comparativa de 6 métodos de extração e 2 de purificação.

Todos utilizam a técnica de EFS para o preparo de amostras. Dubois, Pierret e Delahaut (2004) apresentaram um método de LC-MS/MS com ionização eletrospray (ESI) como fonte de ionização para determinação de 9 coccidiostáticos em ovos e carne de frango, utilizando acetonitrila e sulfato de sódio para precipitação das proteínas. Chéneau e colaboradores (2007) desenvolveram e validaram um método de LC-MS/MS para estudos de farmacocinética para determinar a concentração de monensina em plasma e tecido de frango. Moloney e colaboradores (2012) validaram um método para a determinação de 20 coccidiostáticos por UHPLC-MS/MS em ovos e músculo de frango, com acetonitrila para precipitação das proteínas. Tkáčitová e colaboradores (2012) desenvolveram um estudo para

determinar o nível de resíduos de lasalocida em tecidos de frango de animais que ingeriram ração com 100 mg/kg de lasalocida e período de 5 dias de carência antes do abate. Burnett e colaboradores (2012) validaram um método de LC-MS/MS para determinar e confirmar monensina e narasina em tecido animal. Stubbings e Bigwood (2009) desenvolveram e validaram um método multiclasse por LC-MS/MS e estudaram seis tipos diferentes de extração e dois tipos de purificação. Kim e colaboradores (2012) fizeram uma análise quantitativa com extração simultânea de lincomicina e narasina em carne de frango, leite e ovos. Chang, Su e Cheng (2013) desenvolveram a técnica de extração *online* acoplada à cromatografia líquida com espectrometria de massas com sistema de detecção de armadilha de íons (*ion trap*) para maduramicina em carne de frango.

Tabela 2. Resumo das condições analíticas para a determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em frango por LC-MS/MS ou UHPLC-MS/MS dos métodos indentificados na literatura

Referências	Analitos	Preparo da amostra			Técnica cromatográfica		Espectrometria de massas	
		Quantidade	Extração	EFS	FE	Fase móvel e técnica	AM	FI
Dubois; Pierret; Delahaut (2004)	Coccidiostáticos sintéticos, MON, LAS, NAR, SAL e MAD.	5 g	Desproteínização com ACN e Na ₂ SO ₄	sílica	C18	Gradiente de água e ACN cada um com 0,1% de ácido fórmico (LC – MS/MS)	Micromass Quattro Ultima tandem mass spectrometer	ESI
Chéneau et al. (2007)	MON	2 g	Desproteínização com solução metanol:água (87:13, v/v)	C18	C18	Gradiente de água e ACN cada um com 0,1% de ácido fórmico (LC – MS/MS)	PE Sciex API 2000	ESI
Moloney et al. (2012)	Coccidiostáticos sintéticos, laidlomocina, SEN, LAS, MON, SAL, NAR, MAD.	5 g	Desproteínização com ACN	Sílica	C8	Água e ACN cada um com 0,1% de ácido fórmico (UHPLC-MS/MS)	Waters Quattro Premier triple quadrupole	ESI
Tkácikova; Kozárova; Máté. (2010)	MAD	2 g	Desproteínização com ACN	Strata-X	C18	Metanol:água: ácido acético glacial (900:99:1, v/v/v)(LC-MS)	MicroMass Quattro Micro triple quadrupole	ESI
Tkácikova et al. (2012)	LAS	2 g	Desproteínização com ACN.	Strata-X	C18	Metanol:água desionizada: ácido acético glacial (900:99:1, v/v/v) (LC-MS)	MicroMass Quattro Micro spectrometer with a triple-quadrupole mass analyser	ESI

Continuação da tabela 2

Referências	Analitos	Preparo da amostra			Técnica cromatográfica		Espectrometria de massas	
		Quantidade	Extração	EFS	FE	Fase móvel	AM	FI
Burnett et al. (2012)	NAR e MON	1 g	Desproteínização com isooctano, acetato de etila e Na ₂ SO ₄	Sílica	C18	Água com ácido Fórmico, ACN com ácido Fórmico	QqQ	ESI
Stubbings; Bigwood. (2009)	Derivados do nitroimidazol, sulfonamidas, dinitrocarbanilide, MON, MAD, LAS, NAR,	5 g	Desproteínização com ACN e Na ₂ SO ₄ (E1). MgSO ₄ (E2). ACN com ácido acético e Na ₂ SO ₄ (E3) e com MgSO ₄ (E4). Água, ACN, Na ₂ SO ₄ e MgSO ₄ (E5). ACN com ácido acético e Na ₂ SO ₄ e MgSO ₄ (E6)	SAX, NH ₂ , PSA (C1); D-EFS (PSA,.NH ₂) (C2)	C18	Gradiente de água e ACN cada um com 0,1% de ácido fórmico (LC-MS/MS)	QqQ	ESI
Kim et al. (2012)	Lincomicina e NAR.	2g	Desproteínização com ACN	C18	C18	Gradiente de água e metanol cada um com 10 mol/L de formiato de amônio e 1% de ácido fórmico (LC-MS)	Q trap	ESI
Chang; Su; Cheng. (2013).	MAD	1 g	Desproteínização com metanol	C18	C18	Metanol:água (98:2, v/v) (LC-MS/MS)	Ion trap	ESI

ACN: acetonitrila. EFS: Extração em Fase Sólida. FE: Fase Estacionária. AM: Analisador de Massa. FI: Fonte de Ionização. E1: Experimento 1. E2: Experimento 2. E3: Experimento 3. E4: Experimento 4. E5: Experimento 5. E6: Experimento 6.

Devido à maioria dos medicamentos veterinários e seus produtos de biotransformação serem muito polares, solúveis em água, não voláteis ou termicamente lábeis, a cromatografia líquida é a técnica de separação escolhida para sua determinação.

A simplicidade de execução e possibilidade de obtenção de baixos limites de detecção na análise de resíduos de medicamentos veterinários fizeram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência tornar-se atrativa para análise de medicamentos veterinários. Os sistemas de HPLC com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível só eram aplicáveis com o uso de derivatizações, normalmente pós-coluna. Com a introdução da técnica de ionização à pressão atmosférica, resíduos de medicamentos veterinários com alto peso molecular e termosensíveis puderam ser determinados por LC-MS/MS e no final dos anos 1990 esta passou a ser usada como a técnica de escolha para análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos (PRESTES et al, 2013). Desde a introdução da técnica de ionização com pressão atmosférica (API), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem tido grande importância no desenvolvimento das análises. A ionização por eletrospray (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI) são as mais populares na API. O APCI foi desenvolvido, pois o ESI não era sensível para substâncias químicas menos polares. Em 2000, a fotoionização à pressão atmosférica (APPI) emergiu como uma nova técnica de ionização expandindo a aplicação da API para substâncias de baixa polaridade ou apolares que poderiam ser dificilmente detectadas por ESI ou APCI (DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2007).

A partir dos anos 2000 a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) passou a ser utilizada amplamente como detector na análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal permitindo a obtenção de espectros de massas no modo de varredura facilitando a identificação de substâncias, incluindo compostos desconhecidos (PRESTES et al, 2013).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para a determinação de resíduos de antibióticos ionóforos poliéteres em frango, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes procedimentos de extração/purificação e selecionar o mais adequado;
- Avaliar os parâmetros de linearidade e efeito matriz absoluto do método selecionado;
- Avaliar a aplicabilidade do método em diferentes cortes de músculo de frango;
- Aplicar o método em amostras de peito de frango comercializadas no Rio de Janeiro.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Padrões

Os ionóforos poliéteres utilizados foram: lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina. A nigericina foi utilizada como padrão interno no método para fins qualitativos, uma vez que possui características físico-químicas semelhantes aos ionóforos poliéteres em estudo e não é utilizada na medicina humana e veterinária.

- a) nigericina sódica – NIG (Sigma – Aldrich, EUA);
- b) narasina A – NAR (Sigma – Aldrich, EUA);
- c) salinomicina – SAL (Sigma – Aldrich, EUA);
- d) lasalocida A sódica – LAS (Dr. Ehrenstofer, Alemanha);
- e) maduramicina α de amônio – MAD (Dr. Ehrenstofer, Alemanha);
- f) monensina A sódica hidratada – MON (Dr. Ehrenstofer, Alemanha);
- g) senduramicina sódica – SEN (Phibro Animal Health, EUA).

3.1.2 Reagentes e solventes

- a) acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida (J. T. Baker, EUA);
- b) acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida LC/MS (Merck, Alemanha);
- c) acetato de etila 99,5% (Merck, Alemanha);
- d) ácido fórmico (FOA) 98-100% (Merck, Alemanha);
- e) acetato de sódio (NaOAc) ultra puro com pureza de 99,9% (Merck, Alemanha);
- f) metanol (MeOH) para cromatografia líquida (J. T. Baker, EUA);
- g) hexano para cromatografia líquida (Merck, Alemanha);
- h) água purificada tipo I (Milli-Q);
- i) sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro para análise orgânica de traços (Merck, Alemanha).
- j) sulfato de magnésio (MgSO_4) anidro com pureza igual ou superior a 98% (Merck, Alemanha).

- k) QuEChERS Kit. AOAC 2007.01 Method Packet, 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de acetato de sódio (Phenomenex, EUA).
- l) QuEChERS dSPE Kit: 1,2 g de sulfato de magnésio, 0,4 mg de amina primária e secundária (PSA) e 0,4 mg de octadecilsilano (C18) (Phenomenex, EUA);
- m) Bondesil-PSA, 400M (Varian, EUA);
- n) Nucleosil[®] 120-5 C18 (Dartford, UK);

3.1.3 Equipamentos e acessórios

- a) Sistema LC-MS/MS composto de Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência Shimadzu Prominence (Japão) e espectrômetro de massas sequencial API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex (EUA), com interface TurboIonspray[®]. O software Analyst[®] 1.4.2 foi empregado para controle do sistema, aquisição e análise dos dados. A configuração do cromatógrafo a líquido compreende uma bomba quaternária LC-20AD, um degaseificador de membrana DGU-20A5, um autoamostrador SIL-20AC, um forno de coluna CTO-20AC e uma controladora CBM-20A;
- b) coluna cromatográfica ACE C18 (2,1 x 50 mm, 3 µm de tamanho de partícula) (Advanced Chromatography Technologies, Escócia);
- c) coluna de guarda ACE C18 (Advanced Chromatography Technologies, Escócia);
- d) balança semi-micro com resolução de 0,00001 g (Metler Toledo, Suíça);
- e) balança analítica LP 620P (Sartorius, Alemanha);
- f) módulo de aquecimento/agitação com unidade de evaporação com nitrogênio React-Therm III (Pierce, EUA);
- g) módulo de evaporação Reacti-Vap III (Pierce, EUA);
- h) termômetro digital que compreenda a faixa de 40-55 °C, com resolução de 0,1°C;
- i) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
- j) agitador de tubos tipo vórtex (Marconi, Brasil);
- k) mesa agitadora (Marconi, Brasil);
- l) freezer de temperatura ultra-baixa (Revco, EUA);
- m) refrigerador (Brastemp, Brasil);
- n) capela de exaustão;
- o) sistema de obtenção de água purificada tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA).

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Condições cromatográficas e espectrométricas

Foram utilizadas as condições cromatográficas e espectrométricas descritas por Spisso e colaboradores (2010) e modificadas por Pereira (2013).

O programa de gradiente de eluição apresentado na tabela 3 foi o mesmo empregado anteriormente para a separação de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincomicina em matriz ovo (Spisso et al. 2010). As fases móveis A, B e C utilizadas foram H₂O, ACN e MeOH, respectivamente, todas com 0,1% FOA. O fluxo foi de 0,3 mL/min a 35°C e a temperatura do auto-amostrador foi ajustada a 4°C. O volume de injeção do sistema cromatográfico foi de 10 µL.

O modo de ionização utilizado foi o eletrospray positivo, com aquisição por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) e foram monitoradas 3 transições para cada substância. A otimização dos parâmetros de MRM feita por Spisso e colaboradores (2010) e Pereira (2013), realizada por infusão direta dos padrões de ionóforos poliéteres a 50 ng/mL em MeOH:FOA 1% com 2 mmol/L de NaOAc (80:20, v/v) e em ACN:FOA 1% com 2 mmol/L de NaOAc (80:20, v/v), somente para a SEN, encontram-se na tabela 4. Outros parâmetros selecionados na infusão automática foram: voltagem do *ionspray* de 4500 V, temperatura da fonte de 450°C e voltagem do potencial de entrada de 10 V. Os parâmetros *declustering potential* (DP), *collision energy* (CE) e *collision exit potential* (CXP) foram otimizados para cada transição de MRM com *dwel times* de 20 ou 25 ms (Tabela 4). Nitrogênio foi empregado como gás de nebulização e de secagem (55 psi), gás de colisão (10, unidade arbitrária) e gás de cortina (*Curtain gas*TM, 10 psi).

Tabela 3 - Programa de eluição do gradiente

Tempo (min)	%A	%B	%C
0	93	7	0
4	20	80	0
4,1	5	95	0
6	0	100	0
8	0	100	0
8,5	0	0	100
11,5	0	0	100
12	93	7	0
18	93	7	0

fonte: (SPISSO et al., 2010)

Tabela 4 - Condições analíticas do sistema LC-MS/MS para a determinação de ionóforos poliéteres

Analito	Tempo de retenção (min)	Massa ¹ (u)	Íon precursor ² (m/z)	Íon produto (m/z)	Dwell (ms)	DP ³	CE ⁴	CXP ⁵
LAS A	7,76 a 7,86	590,38	613,27	377,30	20	316	49	30
				577,20			45	20
				595,40			39	14
MAD α	8,82 a 8,93	916,54	939,56	877,50	20	301	45	32
				895,50			65	32
				859,50			81	30
MON A	8,37 a 8,47	670,43	693,39	675,30	25	341	51	24
				479,30			69	18
				461,20			67	32
NAR A	8,60 a 8,70	764,51	787,44	431,20	25	341	73	34
				531,30			63	20
				403,30			83	16
NIG	9,22 a 9,33	724,47	747,49	703,40	25	341	75	26
				729,40			55	24
				501,30			77	18
SAL A	8,22 a 8,32	750,49	773,48	431,10	20	346	67	32
				531,20			61	20
				265,20			71	22
SEN	7,78 a 7,87	872,51	895,47	833,40	20	246	39	20
				705,40			81	18
				851,50			51	26

¹Massa monoisotópica exata do ácido livre, considerando as massas atômicas exatas dos isótopos mais abundantes. ²Íon precursor para LAS A, MAD α , MON A, NAR A, NIG, SAL e SEN = [M+Na]⁺;

³Declustering Potential (V); ⁴Collision Energy (V); ⁵Collision Exit Potential (V).

3.2.2 Preparo de soluções

3.2.2.1 Soluções padrão

Os padrões de ionóforos poliéteres foram preparados a fim de obter uma concentração de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. A massa teórica pesada para cada padrão foi calculada considerando correções de pureza, teor de água e ácido livre. Somente a lasalocida foi preparada na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol, pois o padrão comercializado é uma solução de 100 $\mu\text{g/mL}$ em acetonitrila. As soluções foram transferidas para microtubos e estocadas em freezer a temperaturas igual ou inferiores a -70°C .

3.2.2.2 Soluções padrão intermediárias

Soluções padrão intermediárias foram preparadas em metanol em concentrações apropriadas a partir das soluções padrão estoques utilizando micropipetas de volumes variados (de 20 μL a 5000 μL).

3.2.2.3 Solução do padrão interno para fortificação no início do procedimento

Solução padrão de nigericina 0,6 µg/mL em metanol:água (1:1 v/v) foi preparada para fortificação. Padrão interno.

3.2.2.4 Soluções padrão em metanol:água (1:1 v/v) para fortificação no início do procedimento (curva de calibração)

As soluções foram preparadas em concentrações para a fortificação das amostras nos níveis equivalentes a 0,25 a 3 LMR, adotando-se os LMR recomendados pela União Europeia e *Codex Alimentarius*, a saber: LAS (20 µg/kg), MAD (30 µg/kg), MON (10 µg/kg), NAR (15 µg/kg) e SAL (5 µg/kg), exceto a SEN para a qual se adotou um valor de 10 µg/kg para que a concentração ficasse próxima aos das demais substâncias. Para futura validação essa concentração poderá ser ajustada.

- a) Solução de nigericina (padrão interno) 6 µg/mL em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) – P0M.
- b) Soluções do analito alvo a 0,1 µg/mL para MON e SEN, 0,15 µg/mL para NAR, 0,05 µg/mL para SAL e 0,3 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 0,25 LMR – P1M.
- c) Soluções do analito alvo a 0,2 µg/mL para MON e SEN, 0,3 µg/mL para NAR, 0,1 µg/mL para SAL e 0,6 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 0,5 LMR/LMR – P2M.
- d) Soluções do analito alvo a 0,4 µg/mL para MON e SEN, 0,6 µg/mL para NAR, 0,2 µg/mL para SAL e 1,2 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 1 LMR – P3M.
- e) Soluções do analito alvo a 0,6 µg/mL para MON e SEN, 0,9 µg/mL para NAR, 0,3 µg/mL para SAL e 1,8 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 1,5 LMR – P4M.
- f) Soluções do analito alvo a 0,8 µg/mL para MON e SEN, 1,2 µg/mL para NAR, 0,4 µg/mL para SAL e 2,4 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 2 LMR – P5M.

- g) Soluções do analito alvo a 1 µg/mL para MON e SEN, 1,5 µg/mL para NAR, 0,5 µg/mL para SAL e 3 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 2,5 LMR – P6M.
- h) Soluções do analito alvo a 1,2 µg/mL para MON e SEN, 1,8 µg/mL para NAR, 0,6 µg/mL para SAL e 3,6 µg/mL para MAD em metanol:água (MeOH:H₂O, 1:1 v/v) equivalente a 3 LMR – P7M.

3.2.2.5 *Hexano com acetonitrila*

Adicionou-se 1,6 mL de acetonitrila a 38,4 mL de hexano e homogeneizou-se, a fim de se obter uma mistura contendo 4% de acetonitrila em hexano.

3.2.2.6 *Solvente de reconstituição (diluyente)*

Adicionou-se 70 mL de solução de acetato de sódio 5 mmol/L a 30 mL de metanol e homogeneizou-se, a fim de se obter uma mistura 70:30 (v/v) de acetato de sódio 5 mmol/L e metanol.

3.2.3 *Estudo de diferentes procedimentos de extração e purificação (clean-up)*

3.2.3.1 *Primeiro conjunto de experimentos de extração (1A a 4A)*

Inicialmente o desenvolvimento do método foi baseado em estudos previamente realizados em ovos e leite (SPISSO et al. 2010; PEREIRA, 2011) a fim de verificar a aplicabilidade destes métodos para a matriz músculo de frango. Foram propostos quatro diferentes experimentos de extração (1A, 2A, 3A e 4A).

3.2.3.2 *Segundo conjunto de experimentos de extração e purificação (1B a 5B)*

O segundo conjunto do estudo foi baseado em artigos científicos de determinação de ionóforos poliéteres em músculo de frango e de métodos desenvolvidos para outras classes de antibióticos em tecido e estes foram adaptados para a matriz e classe do presente estudo (ANASTASSIADES et al, 2003; STUBBINGS; BIGWOOD, 2009; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2013) a fim de verificar a aplicabilidade destes

métodos para a matriz carne de frango. Foram propostos cinco diferentes experimentos de extração e purificação (1B, 2B, 3B, 4B e 5B).

3.2.3.3 *Amostra de frango*

Para o desenvolvimento do método foi empregado uma amostra de peito de frango proveniente de um frango caipira criado livre de antibióticos de uma marca comercial adquirida em supermercado na região oeste do Rio de Janeiro. O frango foi cortado e peito, coxa e sobrecoxa separados. Ossos, pele e gordura aparente foram removidos. Os tecidos foram processados em liquidificador. Amostras provenientes do peito, coxa e sobrecoxa foram previamente testadas com os conjuntos de experimentos e com o teste escolhido a fim de confirmar a ausência dos analitos alvo.

3.2.3.4 *Preparo das amostras para ensaio*

- a) Amostra branca (sem analitos alvo e sem padrão interno): Foram pesados 2 g da amostra de frango previamente processada comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 100 μ L de MeOH:H₂O (1:1, v/v) e agitados em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento aos procedimentos de extração conforme descritos nas seções 3.2.3.5.1 a 3.2.3.5.9.
- b) Amostra fortificada no início do procedimento no LMR (amostra branca fortificada com analitos alvo na concentração equivalente ao LMR). Foram pesados 2 g da amostra de frango previamente processada comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 50 μ L da solução de NIG a 0,6 μ g/mL (seção 3.2.2.3) e 50 μ L da solução padrão de IP nas concentrações equivalentes ao LMR (seção 3.2.2.4 alínea d). Agitou-se em vórtex por 10 segundos e após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento aos procedimentos de extração conforme descritos nas seções 3.2.3.5.1 a 3.2.3.5.9.
- c) amostra fortificada no final do procedimento no LMR. O extrato seco de uma amostra branca, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão de IP na concentração equivalente ao LMR e de NIG na concentração equivalente a 6 μ g/mL.

3.2.3.5 Procedimentos de extração

Para cada experimento descrito foram processadas as seguintes amostras:

- ✓ 1 amostra branca de carne de frango;
- ✓ 2 amostras brancas fortificadas no início do procedimento com analitos alvo na concentração equivalente ao LMR;
- ✓ 1 amostra branca fortificada no final do procedimento com analitos alvo na concentração equivalente ao LMR.

3.2.3.5.1 Experimento 1A (Extração direta com acetonitrila)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Em seguida agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 10000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.2 Experimento 2A (Extração com adição de Na₂SO₄)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição.

Adicionou-se 8 g de Na₂SO₄ e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Em seguida agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 10000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.3 Experimento 3A (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na

segunda adição. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄ (Kit) e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Em seguida agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 10000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.4 Experimento 4A (Extração com adição de MgSO₄ e NaOAc após a primeira etapa de centrifugação)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de acetonitrila, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Em seguida agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 10000 rpm e 5 minutos. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄ e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Em seguida agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 10000 rpm e 5min. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.5 Experimento 1B (Extração com ACN:Acetato de etila: H₂O (9:0,4:0,6, v/v/v) com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com PSA, C18 e MgSO₄)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de ACN:Acetato de etila: H₂O (9:0,4:0,6, v/v/v), agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS Kit) e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 5000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 2 mL do sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 200 mg de PSA, 200 mg de C18 e 600 mg MgSO₄ (QuEChERS dSPE Kit). Agitou-se por 1 minuto no vórtex individual e centrifugou-se a 4 °C e 5000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.6 Experimento 2B (Extração com ACN com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com PSA, C18 e MgSO₄)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de ACN, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS Kit) e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 5000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 2 mL do sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 200 mg de PSA, 200 mg de C18 e 600 mg MgSO₄ (Kit). Agitou-se por 1 minuto no vórtex individual e centrifugou-se a 4 °C e 5000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.7 Experimento 3B (Extração com ACN com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com PSA)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de ACN, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS Kit) e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 5000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 2 mL do sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 200 mg de PSA. Agitou-se por 1 minuto no vórtex individual e centrifugou-se a 4 °C e 5000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.8 Experimento 4B (Extração com ACN com adição de MgSO₄ e NaOAc e purificação com C18)

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de ACN, agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Adicionou-se 0,2 g de NaOAc e 0,8 g de MgSO₄ (QuEChERS Kit) e agitou-se em vórtex individual por 10 segundos e em vórtex múltiplo por 1 minuto. Agitou-se em

mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 5000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 2 mL do sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 200 mg de C18. Agitou-se por 1 minuto no vórtex individual e centrifugou-se a 4 °C e 5000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 250 µL do extrato para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.5.9 *Experimento 5B (Extração com ACN:H₂O e etapa de clean up com C18 e hexano)*

A amostra foi extraída com duas porções de 4,0 mL de ACN:H₂O (4:1, v/v), agitando-se em vórtex individual por 1 minuto na primeira adição e por mais 1 minuto em vórtex múltiplo na segunda adição. Agitou-se em mesa agitadora por 20 minutos a 240 rpm. Após repouso de 5 minutos, foi centrifugada a 4 °C, 5000 rpm e 5 minutos. Foram transferidos 2 mL do sobrenadante para um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 400 mg de C18. Adicionou-se 8 mL de hexano com ACN e agitou-se por 1 minuto no vórtex individual. Centrifugou-se a 4 °C e 5000 rpm por 5 minutos. A camada do hexano foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferiu-se 250 µL do extrato remanescente (camada inferior) para um tubo de polipropileno de 15 mL e foi dado prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.6.

3.2.3.6 *Procedimento de evaporação e ressuspensão*

Evaporou-se à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 °C. Os extratos secos foram reconstituídos com 1 mL do diluente 5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v, agitados em vórtex por 15 segundos e filtrados em filtro de 0,22 µm para *vials* âmbar.

3.2.3.7 *Sequência de injeção*

Foram injetados para cada método: diluente (em duplicata), uma amostra branca (amostra controle conforme - ACC), amostras brancas fortificadas no início do procedimento com analitos alvo na concentração equivalente ao LMR (em triplicata) e amostra branca fortificada no final do procedimento com analitos alvo na concentração equivalente ao LMR (em triplicata).

3.2.4 Avaliação da linearidade e do efeito matriz absoluto

A avaliação da linearidade e do efeito matriz absoluto do método foi efetuada a partir de curvas de calibração construídas para cada analito no solvente de reconstituição (diluyente) e nas amostras, com fortificação no início do procedimento e no final do procedimento (após todas as etapas de extração).

3.2.4.1 Preparo das amostras para ensaio

- a) amostra branca (sem analitos alvo e sem padrão interno): Foram pesados 2 g de uma amostra de peito de frango previamente processada comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 100 μ L de metanol:H₂O (1:1, v/v) e agitados em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento de extração conforme descrito na seção 3.2.3.5.7;
- b) amostra fortificada no início do procedimento nos níveis equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR, incluindo o ponto zero, com a adição do padrão interno NIG: Foram pesados 2 g de uma amostra de peito de frango previamente processada comprovadamente branca em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL, adicionados 50 μ L da solução de NIG (preparado conforme seção 3.2.2.4 alínea a) e 50 μ L da solução padrão de IP para cada nível de concentração preparados conforme seção 3.2.2.4 (P1M – P7M). Agitou-se em vórtex por 10 segundos e após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento aos procedimentos de extração conforme descrito na seção 3.2.3.5.7;
- c) amostra fortificada no final do procedimento nos níveis equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR: O extrato seco da amostra branca, em tubo de 15 mL de polipropileno, foi reconstituído com 1 mL da solução padrão de IP no solvente de reconstituição (5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v) para cada nível de concentração.

As curvas de calibração construídas no solvente de reconstituição (5 mmol/L NaOAc:MeOH, 70:30, v/v) foram preparadas nas concentrações para cada analito nos níveis equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR.

A avaliação da linearidade do método foi efetuada pela análise estatística das curvas de calibração de cada analito obtidas com a fortificação na matriz no início do procedimento.

O efeito matriz absoluto do método em relação aos fenômenos de supressão ou aumento de sinal na ionização considerando a técnica analítica empregada (LC-MS/MS) foi estudado comparando-se a curva de calibração de cada analito obtida com solução padrão (curva no diluente) com aquela obtida com a matriz, com a adição do analito após as etapas de extração, ou seja, com as amostras de peito de frango fortificadas no final do procedimento.

3.2.4.2 Sequência de injeção

Foram injetados: diluente (em duplicata), uma amostra branca (ACC), curva de calibração na matriz com fortificação no início do procedimento, curva de calibração na matriz com fortificação no final do procedimento e curva de calibração no solvente de reconstituição. Todas as curvas foram injetadas em triplicata aleatoriamente.

3.2.5 Avaliação da aplicabilidade do método em diferentes cortes de músculo de frango – Estudo preliminar

Amostras dos músculos da coxa, sobrecoxa e peito, previamente testadas e comprovadamente brancas foram usadas.

Para cada uma das 3 amostras de músculo de frango foram construídas curvas de calibração com a adição dos analitos no final do procedimento nas concentrações equivalentes a 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR, incluindo o ponto zero, com a adição do padrão interno NIG.

Uma amostra branca de cada matriz foi preparada e extraída conforme seções 3.2.4.1 alínea a, 3.2.3.5.7 e 3.2.3.6.

As curvas de calibração obtidas com os diferentes tipos de matriz (coxa, sobrecoxa e peito) foram avaliadas através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) dos coeficientes angulares das curvas de cada analito segundo abordagem descrita no POP de validação do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (INCQS, 2013a).

3.2.5.1 Sequência de injeção

Foram injetados: diluente (em duplicata), amostras brancas e curva de calibração para cada matriz com fortificação no final do procedimento (em triplicata aleatória).

3.2.6 Aplicação do método desenvolvido em amostras de peito de frango comercializadas na cidade do Rio de Janeiro – Estudo preliminar

Com a finalidade de verificar a presença de ionóforos poliéteres em cortes de frango comercializados na cidade do Rio de Janeiro, foi proposto um estudo exploratório em que foram analisadas 13 amostras de filé de peito de frango adquiridas em supermercados da cidade.

3.2.6.1 Preparo das amostras

Gorduras aparentes foram removidas. Os tecidos foram processados em liquidificador e 2 g de amostra foram pesadas em um tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL. Adicionou-se 50 µL de MeOH:H₂O (1:1) e 50 µL da solução de NIG a 6 µg/mL (seção 3.2.2.4 alínea a), agitou-se em vórtex por 10 segundos. Após repouso por 10 minutos foi dado prosseguimento ao procedimento de extração conforme descrito na seção 3.2.3.5.7.

3.2.6.2 Preparo da curva de calibração

Para estimar a concentração de IP nas amostras foram construídas curvas de calibração na matriz isenta dos analitos alvo (amostra de peito de frango, código do laboratório ABR-2014/002) com a fortificação no início do procedimento, em sete níveis de concentração (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 vezes o LMR), além do ponto zero, com adição do padrão interno NIG conforme descrito na seção 3.2.2.4 (alínea a).

Uma amostra branca (ACC – amostra controle conforme, sem analitos alvo e sem padrão interno) e uma amostra branca de reagentes (ACBR – amostra controle branco de reagentes, utilizando água como substituto da amostra branca, sem os analitos alvo e sem padrão interno) também foram processadas.

A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental e a concentração do analíto e as amostras controle ACC e ACBR permitem detectar se analitos provenientes da amostra tida como branca ou dos reagentes estão contaminando as análises, por estarem aderidos aos recipientes ou aos instrumentos (BRASIL, 2003).

3.2.6.3 *Preparo da amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 1 LMR*

Uma amostra de peito de frango isenta dos analitos alvo (amostra ABR-2014/002) com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1 LMR e adição do padrão interno NIG foi analisada com o objetivo de possibilitar o cálculo de tempo de retenção relativo (ver seção 3.2.6.4 alínea a).

3.2.6.4 *Sequência de injeção*

Foram injetados: diluente (em duplicata), uma amostra branca de reagentes (ACBR), uma amostra branca (ACC), curva de calibração na matriz com fortificação no início do procedimento (em triplicata aleatória), uma amostra fortificada no final do procedimento com concentração equivalente a 1 LMR (em triplicata aleatória) e amostras para ensaio (em duplicata).

3.2.6.5 *Identificação e quantificação dos analitos*

O monitoramento de pelo menos duas transições (par de íons precursor/produto) para cada substância confere ao método analítico o número mínimo de pontos de identificação (*Identifications Points*, IPs) necessários para a confirmação de substâncias por espectrometria de massas sequencial de baixa resolução, conforme os critérios descritos na Decisão 2002/657/EC (UNIÃO EUROPEIA, 2002). Embora duas transições fossem suficientes, três transições para cada analito foram selecionadas. A transição de MRM mais intensa foi escolhida para a quantificação e duas transições adicionais foram monitoradas para confirmação.

A identificação e confirmação dos ionóforos poliéteres nas amostras foi efetuada de acordo com a Decisão 657/2002 (UNIÃO EUROPEIA, 2002) pelos seguintes critérios:

- a) tempo de retenção relativo (t_{Rrel}): a razão entre o tempo de retenção (t_R) do analito, que é o tempo necessário para a zona do analito alcançar o detector após a injeção da amostra com o padrão interno NIG na amostra, isto é, o t_{Rrel} do analito na matriz deverá ser o mesmo daquele obtido na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1 LMR, com o padrão interno NIG, com uma margem de erro de $\pm 2,5\%$;

- b) razão sinal/ruído (S/R): pela detecção de pelo menos duas transições específicas (transição de quantificação e de confirmação) com razão sinal/ruído superior ou igual a 3 nas duas transições, no tempo de retenção característico. Utilizou-se a técnica de estimação do sinal/ruído pelo software Analyst[®] por pico a pico (*S-to-N using Peak-to-Peak*);
- c) razão de íons: a razão da intensidade de sinal (área) entre os picos correspondentes às duas transições detectadas na amostra não deverá exceder os valores apresentados na tabela 3 em relação à mesma razão na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1 LMR, com o padrão interno NIG.

Cálculo da razão de íons:

$$\text{Razão de íons} = \frac{\text{Área da transição de confirmação}}{\text{Área da transição de quantificação}}$$

Tabela 5 - Variação aceitável para intensidade relativa das transições de quantificação e confirmação dos analitos na amostra com fortificação no final do procedimento, com os analitos alvo na concentração equivalente a 1 LMR, com o padrão interno

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

A quantificação dos analitos nas amostras foi efetuada diretamente por interpolação na curva de calibração obtida para cada analito pelo método dos mínimos quadrados ponderados, com peso equivalente a $1/y$, empregando o software Analyst[®].

Amostras foram consideradas detectadas, com resíduos de ionóforos poliéteres, quando os critérios de identificação/confirmação foram atendidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO (CLEAN-UP)

O primeiro conjunto de experimentos de extração foi baseado em estudos realizados em ovos e leite (SPISSO et al. 2010; PEREIRA, 2011) e estes experimentos correspondem aos testes de 1A ao 4A da figura 2. O segundo conjunto de experimentos que se refere aos testes 1B a 5B (figura 2) foi baseado em artigos científicos de determinação de IP em músculo de frango e de métodos desenvolvidos para outras classes de antibióticos em tecido e estes foram adaptados para a matriz e classe do presente estudo (STUBBINGS; BIGWOOD, 2009; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2013).

A acetonitrila é um solvente amplamente utilizado para precipitação de proteínas e foi utilizada na maioria dos experimentos testados. No teste 1B utilizou-se uma mistura de acetonitrila:acetato de etila:água e no teste 5B utilizou-se uma mistura de acetonitrila:água (figura 2).

Todos os estudos de recuperação foram efetuados nos níveis de concentração equivalentes aos LMR para cada analito. A tabela 6 apresenta os resultados de recuperação e de desvios padrão relativos (RSD) referentes aos testes 1A a 4A e a tabela 7 aos testes 1B a 5B.

Figura 2 - Resumo das técnicas de extração/purificação empregadas

	1º Conjunto de experimentos				2º conjunto de experimentos				
	Teste 1A	Teste 2A	Teste 3A	Teste 4A	Teste 1B	Teste 2B	Teste 3B	Teste 4B	Teste 5B
Massa	2 g				2 g				
Solvente de extração	8 mL ACN				8 mL ACN:Acetato de etila: H ₂ O (9:0,4:0,6, v/v)	8 mL ACN	8 mL ACN	8 mL ACN	8 mL ACN:H ₂ O (4:1, v/v)
Sais de extração *		8 g Na ₂ SO ₄	0,2 g CH ₃ COONa 0,8 g MgSO ₄		0,2 g CH ₃ COONa , 0,8 g MgSO ₄				
	Centrifugação 1				Centrifugação 1				
Sais de extração **				0,2 g CH ₃ COONa 0,8 g MgSO ₄					
Purificação (clean-up)					200 <u>mg</u> PSA 200 <u>mg</u> C18 600 <u>mg</u> MgSO ₄	200 <u>mg</u> PSA 200 <u>mg</u> C18 600 <u>mg</u> MgSO ₄	200 mg PSA	200 mg C-18	400 mg C18 8 mL <u>hexano saturado com ACN</u>
	Centrifugação 2				Centrifugação 2				
Evaporação	Fluxo de N ₂ a 46-48°C				Fluxo de N ₂ a 46-48°C				
Ressuspensão e injeção	<u>Ressuspensão com MeOH:NaOAc 5 mmol/L (30:70, v/v).</u>				<u>Ressuspensão com MeOH:NaOAc 5 mmol/L (30:70, v/v).</u>				

Tabela 6 - Recuperação do 1º conjunto de experimentos (eficiência do processo de extração/purificação) e RSD

Analitos	Teste 1A		Teste 2A		Teste 3A		Teste 4A	
	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%
LAS	70	23	48	34	64	22	88	6
MAD	76	32	40	75	54	10	104	46
MON	81	33	62	35	50	9	60	22
NAR	56	41	46	45	41	18	97	10
SAL	69	12	43	43	56	42	73	18
SEN	72	25	69	36	56	17	85	18

Rec%: Recuperação. RSD%: Desvio padrão relativo.

Tabela 7 – Recuperação do 2º conjunto de experimentos (eficiência do processo de extração/purificação) e RSD

Analitos	Teste 1B		Teste 2B		Teste 3B		Teste 4B		Teste 5B	
	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD%	Rec%	RSD %
LAS	59	4	27	17	60	3	84	9	62	7
MAD	77	3	55	2	93	5	65	16	67	12
MON	79	3	54	1	91	7	67	5	86	6
NAR	63	4	37	2	93	3	48	28	59	13
SAL	64	2	42	5	91	4	101	53	70	9
SEN	86	6	68	5	92	5	85	8	94	10

Rec%: Recuperação. RSD%: Desvio padrão relativo.

No primeiro conjunto de experimentos, como pode ser observado na tabela 6 (testes 1A a 4A) foram obtidos altos valores de desvios padrão relativos (RSD) para a maioria dos analitos, evidenciando baixa repetibilidade destes métodos de extração. Então, estes experimentos foram abandonados tanto pela baixa repetibilidade quanto pela necessidade de maior frequência na manutenção e limpeza da fonte do equipamento (LC-MS/MS).

Nos experimentos referentes aos testes 1B a 5B (tabela 7), onde foi incluída uma segunda etapa de *clean-up* utilizando extração em fase sólida dispersiva, os resultados obtidos

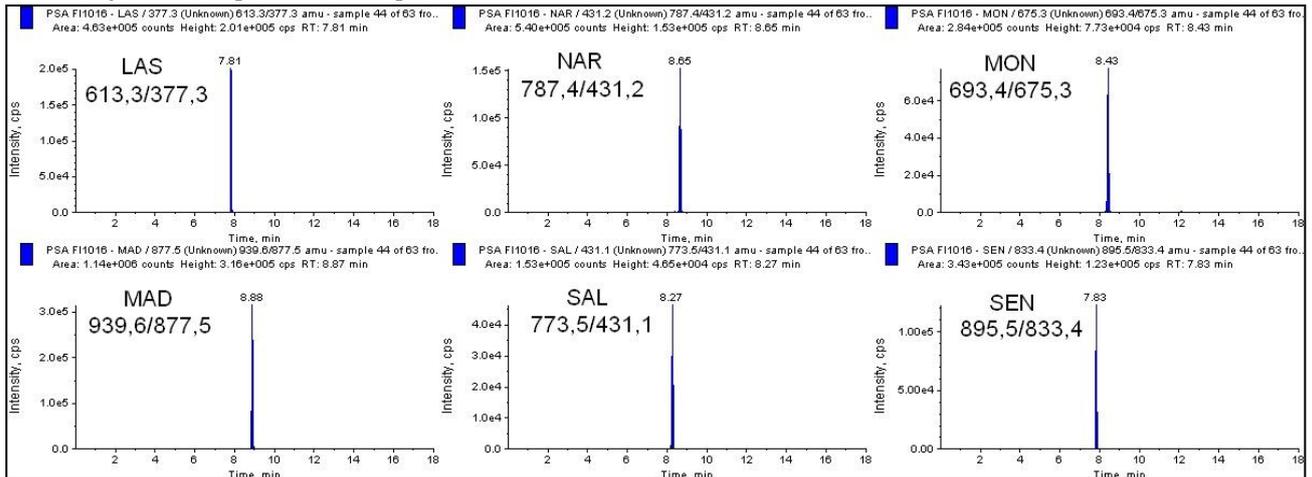
foram melhores quando comparados aos primeiros experimentos (testes 1A a 4A), o que mostra uma redução de possíveis interferências da matriz.

Os testes 1B e 2B se diferem apenas pelo solvente de extração. O teste 1B, que utilizou como solvente (ACN:Acetato de etila:H₂O), apresentou melhores resultados tanto de recuperação quanto de RSD para a maioria dos analitos quando comparado ao teste 2B com ACN. Os testes 2B, 3B e 4B se diferem somente nas substâncias utilizadas na segunda etapa de extração em fase sólida dispersiva. O teste 4B, que utilizou C18, apresentou altos valores de RSD para os analitos MAD, NAR e SAL. O teste 2B, com PSA, C18 e MgSO₄, apresentou resultados satisfatórios de RSD, exceto pela LAS, mas com baixos valores de recuperação. O teste 3B, que utilizou somente PSA na segunda etapa de *clean up*, apresentou os melhores resultados tanto de recuperação quanto de RSD quando comparado aos demais experimentos. A utilização de PSA é descrita por ser capaz de promover a remoção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz por ter uma estrutura bidentada e um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário (PRESTES et al., 2013). O teste 5B, baseado e adaptado do método multiresíduos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2013), mas que não inclui os IP, também apresentou resultados satisfatórios, entretanto a recuperação foi baixa para a NAR (59%) quando comparada ao teste 3B (93%) e os valores de RSD para MAD e NAR foram acima de 10%, 12% e 13% respectivamente. Além disso, apresenta na segunda etapa de *clean-up* uma extração líquido-líquido com hexano, que é inflamável e tóxico, e um maior tempo de análise.

O teste 3B por ter apresentado excelentes recuperações, baixos valores de RSD para todos os analitos, além de ser um método rápido, foi o selecionado e empregado para a avaliação das curvas de calibração em sete níveis de concentração.

A figura 3 apresenta os cromatogramas de MRM da primeira transição dos ionóforos poliéteres referentes aos extratos obtidos no experimento 3B nas concentrações dos respectivos LMR para cada substância.

Figura 3 - Cromatogramas de MRM da 1ª transição dos IP referentes aos extratos obtidos no experimento 3B nas concentrações dos respectivos LMR para cada substância



4.2 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E DO EFEITO MATRIZ ABSOLUTO

A avaliação da linearidade do método foi efetuada pela análise estatística das curvas de calibração de cada analito obtidas com a fortificação na matriz no início do procedimento.

Os dados experimentais das curvas de calibração na matriz foram checados para verificar a existência de valores aberrantes pelo teste de *Grubbs* no nível de significância de 99% ($\alpha=0,01$) para todos os analitos em cada nível de concentração e não foram identificados valores aberrantes.

Para a curva de calibração com a matriz fortificada no início foi observada heterogeneidade das variâncias para os analitos MON, NAR, SAL e SEN ($p \leq 0,05$) pelo teste de Levene indicando que o uso do método dos mínimos quadrados ordinários não é adequado.

Considerando a heterocedasticidade dos dados, empregou-se para a construção das curvas de calibração para todos os analitos o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso equivalente a $1/y$, onde y é a área.

Para verificar o ajuste ao modelo matemático proposto de regressão linear, obtido pelo MMQP, utilizou-se uma comparação entre este modelo de regressão linear (de primeira ordem) e um modelo de regressão não-linear, polinomial de segunda ordem. Se o valor de $p \leq 0,05$ para o parâmetro de segunda ordem, a adição deste parâmetro melhora significativamente o ajuste do modelo e pode-se concluir que o modelo polinomial de segunda ordem fornece um ajuste mais adequado ao conjunto de dados, indicando desvio da linearidade do modelo de primeira ordem (INCQS, 2013b).

Para todos os analitos não foi identificado desvio da linearidade do modelo de primeira ordem ajustado pelo método do MMQP. Assim, a regressão pelo MMQP indicou ser

adequada e o intervalo linear do detector na presença de matriz foi de 0,25 a 3,0 vezes o LMR para todos analitos.

A avaliação do efeito matriz absoluto foi realizada pela comparação dos coeficientes angulares das duas curvas de calibração (curva de calibração no diluente e curva de calibração na matriz fortificada no final do procedimento) através do teste *t* (Student). Antes de ser efetuada a comparação pelo teste *t* (Student), as variâncias residuais das curvas foram testadas para verificar se eram significativamente diferentes, através do teste *F*.

A comparação dos coeficientes angulares pelo teste *t* indicou que para os analitos MAD, MON e NAR as curvas são estatisticamente diferentes a $\alpha=0,05$, evidenciando efeito matriz absoluto. Dessa forma, para fins quantitativos, as curvas de calibração deverão ser preparadas com os analitos na presença da matriz.

4.3 AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DO MÉTODO EM DIFERENTES CORTES DE MÚSCULO DE FRANGO – ESTUDO PRELIMINAR

Com a finalidade de avaliar a aplicabilidade do método em diferentes cortes de frango foi selecionado uma amostra de frango isenta dos analitos alvo e separados a coxa, sobrecoxa e o peito.

As curvas de calibração obtidas com os diferentes tipos de matrizes (coxa, sobrecoxa e peito) foram avaliadas através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) dos coeficientes angulares das curvas de cada analito (tabela 8) (INCQS, 2013a).

Todos os resultados de RSD dos coeficientes angulares foram inferiores a 15%, conforme recomendado pelo POP (INCQS, 2013a) como pode ser observado na tabela 8, indicando que com este procedimento de extração, para as matrizes estudadas, não foi observado efeito matriz relativo. A figura 4 apresenta as curvas de calibração para o analito SAL nas três matrizes selecionadas.

Figura 4 - Curvas de calibração para o analito SAL nas três matrizes selecionadas

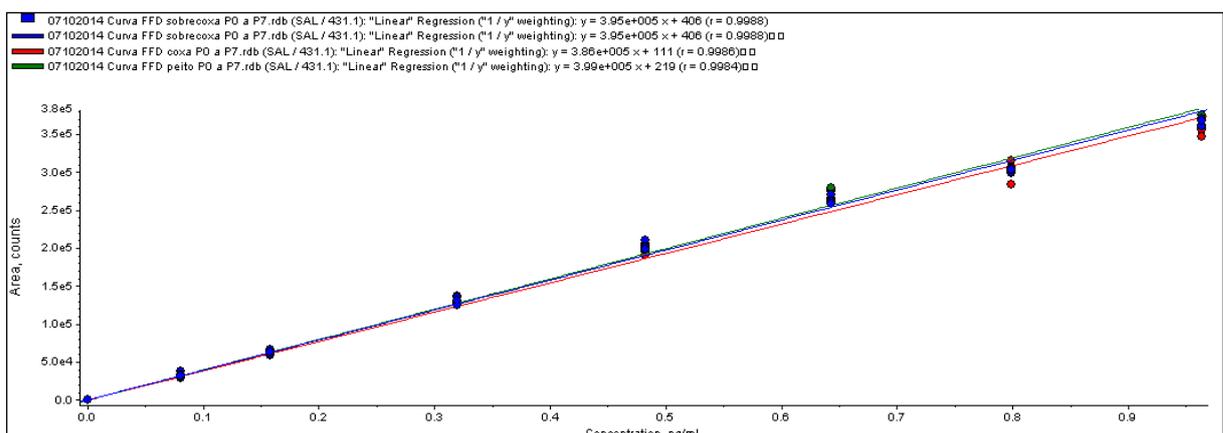


Tabela 8 - Coeficientes angulares das curvas de calibração

Analitos	Sobrecoxa	Coxa	Peito	Média	RSD%
LAS	5,99E+05	5,35E+05	5,32E+05	5,55E+05	6,82
MAD	3,07E+05	2,85E+05	2,88E+05	2,93E+05	4,07
MON	4,44E+05	4,00E+05	4,27E+05	4,24E+05	5,24
NAR	4,69E+05	4,22E+05	4,56E+05	4,49E+05	5,41
SAL	3,95E+05	3,86E+05	3,99E+05	3,93E+05	1,69
SEN	2,29E+05	2,20E+05	2,14E+05	2,21E+05	3,42

Dessa forma, o método desenvolvido poderá ser aplicado após a validação, em diferentes cortes de músculo de frango (coxa, sobrecoxa e peito), pois foi capaz de distinguir de forma inequívoca os analitos sem a interferência de outros componentes, que encontram-se de forma diferenciada nos três tipos de cortes de músculo estudados, tais como lipídios e proteínas. A tabela 9 apresenta a tabela nutricional da carne de frango crua e sem pele.

Tabela 9 - Tabela nutricional dos músculos de frango cru e sem pele

Cortes	Umidade %	Energia (Kcal)	Proteína(g)	Lipídios (g)	Carboidrato
Peito	65,6	163	31,5	3,2	0,0
Sobrecoxa	72,7	162	17,6	9,6	0,0
Coxa	76,4	120	17,8	4,9	0,0

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE PEITO DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO RIO DE JANEIRO – ESTUDO PRELIMINAR

Foram analisadas 13 amostras de peito de frango comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Do total das 13 amostras analisadas não se detectou resíduos de NAR e SEN e 6 amostras foram consideradas contaminadas pelos antibióticos LAS, MAD, MON e SAL, pois atenderam aos critérios de identificação/confirmação de acordo com a Decisão 657/2002 (UNIÃO EUROPEIA, 2002) descritas na seção 3.2.6.4 (razão de íons de duas transições com $S/R \geq 3$ de acordo com as tolerâncias aceitáveis e tempos de retenção relativos dentro da janela de $\pm 2,5$ %). Os resultados indicaram uma prevalência de 46% de amostras consideradas positivas, mas com concentrações estimadas muito inferiores aos LMR preconizados tanto pelo *Codex Alimentarius* quanto pela União Europeia, como pode ser observado na tabela 10.

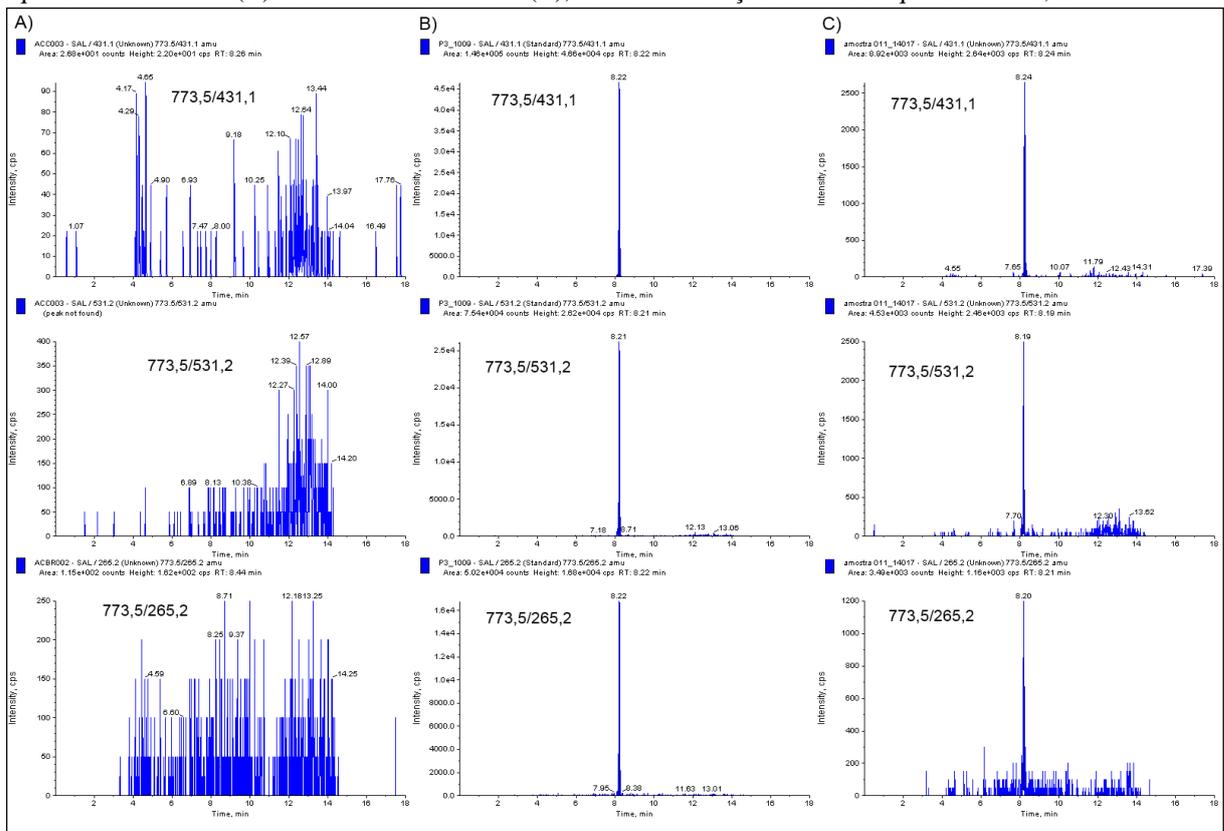
Tabela 10 - Concentrações estimadas de ionóforo poliéteres em 6 amostras de peito de frango

Amostras	Concentração (µg/kg)					
	LAS	NAR	MAD	MON	SAL	SEN
009/2014	-	-	-	-	0,2	-
011/2014	-	-	-	-	0,3	-
012/2014	-	-	-	0,3	-	-
013/2014	-	-	0,3	-	0,2	-
018/2014	0,8	-	-	-	-	-
019/2014	0,4	-	-	-	-	-

No universo estudado, os resultados indicaram que, muito provavelmente, os produtores estão cumprindo as boas práticas veterinárias.

A figura 5 apresenta os cromatogramas de MRM das três transições do analito SAL (uma de quantificação e duas de confirmação) para uma amostra branca (A), uma amostra fortificada com concentração equivalente a 1 LMR (B) e para a amostra 011/2014 (C), com concentração estimada equivalente a 0,06 LMR.

Figura 5 - Cromatogramas de MRM do analito SAL de uma amostra branca (A), de uma amostra fortificada equivalente a 1 LMR (B) e da amostra 011/2014 (C), com concentração estimada equivalente a 0,06 LMR



5 CONCLUSÃO

De todos os experimentos de extração/purificação testados, os que apresentaram melhores resultados foram os referentes aos testes 3B e 5B. O método 3B foi o escolhido, por ter apresentado os melhores resultados tanto de recuperação (60% - 92%) quanto de RSD (3% - 7%) além de possuir vantagens em relação ao método 5B, como menor custo e tempo de análise.

A seleção de três transições de MRM para cada analito conferiu ao método analítico por LC-MS/MS o número de pontos de identificação necessários de acordo com os exigidos pelas normas internacionais.

A partir da avaliação das curvas calibração, o método demonstrou responder de forma linear, nas faixas de concentração definidas pelos limites regulatórios.

O estudo preliminar da aplicabilidade do método indicou que, muito provavelmente, este poderá ser apto após a validação, à avaliação de diferentes cortes de músculo de frango (peito, coxa e sobrecoxa).

O método foi aplicado em amostras de peito de frango coletadas na região metropolitana do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que resíduos de lasalocida, maduramicina, monensina e salinomicina puderam ser detectados em uma concentração estimada muito inferior aos LMR. Esses resultados exploratórios indicam que, se essa amostragem tiver sido representativa, provavelmente os produtores estão cumprindo as boas práticas veterinárias.

Após a validação, o método poderá ser aplicado para análises de rotina, permitindo a avaliação da conformidade de amostras de frango de acordo com os limites recomendados pelo *Codex Alimentarius* e pela Comunidade Europeia visando contribuir para as ações de Vigilância Sanitária de alimentos.

REFERÊNCIAS

ANASTASSIADES et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extration/Partitioning and “ Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, 2003.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY. The Agricultural and Veterinary Chemicals Code Instrument N° 4 (MRL Standard) 2012. Table 1. MRLs of agricultural and veterinary chemicals and associated substances in food commodities. Disponível em: <<http://www.comlaw.gov.au/Details/F2014C01360/Download>>. Acesso em 27 de janeiro de 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 4 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico – Glossário de termos e definições para resíduos de medicamentos veterinários constante do anexo desta resolução. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 5 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasil, DF, 2 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas Internacionais de Referência. 2014. 2014b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Normas+Internacionais+de+Referencia/e2394f8040056dce98189e54e035b7cb>>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PAMVet. 2014c. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6fffacfa6b37f1>>. Acesso em 8 de outubro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RELATÓRIO 2006-2007, Monitoramento de resíduos em leite exposto ao consumo (5° e 6° anos de atividades). 2009. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 8 de outubro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resíduos e contaminantes- animal. 2014d. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Portaria DAS n° 60, de 07 de maio de 2014. 2014e. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/PORTARIA%20n%2060%20-%20PNCRC%202013.pdf>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aditivos melhoradores d desempenho e anticoccidianos registrados na CPAA/DFIP. 2013. Disponível em: < 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Aves. 2014a. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em 27 de outubro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Lei nº 9782 de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e da outras providências. Diário oficial da união 1999; 27 de janeiro; Seção 1:1. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9782.htm>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

BURNETT, T. J. et al. Determination of Narasin and Monensin in Bovine, Swine, and Chicken Tissues by Chromatography With Tandem Mass Spectrometry: First Action 2011.24. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 4, 2012.

CHANG, K. C.;SU, J.;CHENG, C. Development of online sampling and matrix reduction technique coupled liquid chromatography/ion trap mass spectrometry for determination maduramicin in chicken meat. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1522–1529, 2013.

CHÉNEAU, E. et al. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach. **Journal of Chromatography B**. n. 850, p.15–23, 2007.

CLARKE, L. et al. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. **Meat Science**, v. 97, n. 3, p. 358-374, 2014.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS. 21: Food and Drugs. Revised as of April 1, 2014. 21 CFR 556. Washington: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 2009. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=556&showfr=1&subpartnode=21:6.0.1.1.17.2>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2015.

COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Actualizado en la 35a Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius Commission. 2012. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_s_2012.pdf>. Acesso em: 27 de agosto de 2014.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) nº 1831/2003 de 22 de setembro de 2003. Relatório da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu sobre a utilização de coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados a alimentação animal. **Jornal Oficial da União Européia**, n. 29, L. 268, 18 de outubro de 2003. Disponível em: <eur-lex.europa.eu> . Acesso em: 5 de janeiro de 2015.

COMUNIDADE EUROPEIA. Directiva nº 79, de 17 de setembro de 2001. Que altera a Directiva 87/153/CEE do Conselho que fixa linhas directrizes para a avaliação dos. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, 6 out. 2001. p. 1-267.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26. n. 6, 2007.

DUBOIS, M.; PIERRET, G.; DELAHAUT, PH. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p.181–189, 2004.

EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. **Official Journal of the European Union**. L, v. 15, n. 1, 2010. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf>. Acesso em: 27 de agosto de 2014.

HEALTH CANADA. Veterinary Drugs Directorate. Administrative Maximum Residue Limits (AMRLS) and Maximum Residue Limits (MRLS) set by Canada. 2014. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2015.

HUCZYNSKI, A. Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p.7002–7010, 2012.

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.135**: Validação das funções de calibração usando o software Statistica® 8.0. Rev.2. Rio de Janeiro, 2013b. 14p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.136**: Métodos de análise para resíduos de medicamentos veterinários e alimentos. Protocolo de validação. Rev.2. Rio de Janeiro, 2013a. 59p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

KIM, E. et al. 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.

MOLONEY, M.; CLARKE, L.; O´MAHONY, J.; GADAJ, A.; O´KENNEDY, R.; DANAHER, M.; Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1253, p. 94– 104, 2012.

NOGUEIRA, V. A., FRANÇA, T. N., PEIXOTO, P. V. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.3, p. 191-197, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2009000300001&script=sci_arttext. Acesso em 5 de janeiro de 2015.

NOVILLA, M. N.; **Veterinary Toxicology**. Ed. Ramesh C. Gupta. 2007.

OLIVEIRA, E.; BONFANI, C. Antibiótico, e não hormônios, é o maior risco em carne e frango. In: O GLOBO. 2014. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/economia/defesa-do-consumidor/antibiotico-nao-hormonio-o-maior-risco-em-carnes-frangos-13551827>>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

PAMVET-PR. Levantamento de uso e comercialização de medicamento veterinário em frango de corte. Paraná: [Secretaria da Saúde do Paraná], 2005. Disponível em:

<<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>>. Acesso em 8 de outubro de 2014.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLD, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PEREIRA, M. U.; **Desenvolvimento de um método para determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por CLAE-EM/EM**. 2011. 78 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional em Controle em Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://phl.incqs.fiocruz.br/control/tc/Monografia_Mararlene_Ulberg_Pereira.pdf>. Acessado em 23 de junho de 2014.

PEREIRA, M. U.; Determinação de ionóforos poliéteres em leite por LC-MS/MS.. 2013. 149 f. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional em Controle em Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7864/1/MARARLENE_Dissertacao%20%281%29.pdf>. Acessado em 23 de junho de 2014.

PRESTES, O. D. et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v.3, n.1, p. 51-64, 2011.

REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) N.º 388/2011 DA COMISSÃO DE 19 DE ABRIL DE 2011. Concerning the authorisation of maduramicin ammonium alpha as a feed additive for chickens for fattening (holder of authorisation Alpharma (Belgium) BVBA) and amending Regulation (EC) N° 2430/1999. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:104:0003:0006:EN:PDF>>. Acesso em: 29/08/2014.

SPISSO, B. F. Inocuidade de Alimentos de origem animal: Determinação de Resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclina em leite por CLAE-EM/EM. 2010. 197F. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SPISSO, B. F. et al. 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.

STUBBINGS, G.; BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p. 68–78. 2009.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011. 164p. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf .

TKACIKOVA, S.; KOZAROVA, I.; MATE, D. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of maduramycin residues in the tissues of broiler chickens. **Food Additives and Contaminants**, n. 9, v. 27, p. 1226–1232, 2010.

TKACIKOVA, S. et al. Determination of lasalocid residues in the tissues of broiler chickens by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 5, p. 761–769, 2012.

UBABEF. FRANGO. Consumo Per Capita. In: Associação Brasileira de Proteína Animal. 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango/consumo_per_capita>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. **Screening and Confirmation of Animal Drug Residues by UHPLC-MS-MS**. Washington, 2013. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/horses/CLG-MRM1.pdf>> . Acesso em: 21/03/2014.

UNIÃO EUROPEIA Comissão Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão nº 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao dispositivo na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativa ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, Bruxelas, n. L 221, p. 8-36, 17 agosto 2002.