

BERNARDETE FERRAZ SPISSO

**INOCUIDADE DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL: DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES, MACROLÍDEOS E LINCOSAMIDAS
EM OVOS E DE TETRACICLINAS EM LEITE POR CLAE-EM/EM**

PPGVS/INCQS
FIOCRUZ

2010

INOCUIDADE DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL: DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE IONÓFOROS POLIÉTERES, MACROLÍDEOS E LINCOSAMIDAS
EM OVOS E DE TETRACICLINAS EM LEITE POR CLAE-EM/EM

Bernardete Ferraz Spisso

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Vigilância Sanitária.

Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega

Rio de Janeiro

2010

Spisso, Bernardete Ferraz

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./ Bernardete Ferraz Spisso. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

197 f., il., tab.

Tese – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010. Orientador: Armi Wanderley da Nóbrega.

1. Resíduos de medicamentos veterinários. 2. Ionóforos poliéteres. 3. Macrolídeos. 4. Lincosamidas. 5. Tetraciclina. 6. Ovos. 7. Leite. 8. Espectrometria de massas. I. Título.

Animal origin food safety: determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues in eggs and tetracyclines residues in milk by LC-MS/MS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Inocuidade de alimentos de origem animal: determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclinas em leite por CLAE-EM/EM

Bernardete Ferraz Spisso

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora.

Aprovado:

Prof. _____

Dra. Silvana do Couto Jacob

(INCQS/FIOCRUZ)

Prof. _____

Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes

(FEA/UNICAMP)

Prof. _____

Dra. Verônica Lobato

(UFRRJ)

Orientador:

Prof. _____

Dr. Armi Wanderley da Nóbrega

(INCQS/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2010

*À minha filha Amanda, por toda
a força que a sua existência me
transmite. Te amo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha família, por não me deixarem desistir.

À Amanda, Arlindo, Beatriz, Ursula, Henrique, Graça Christina, Valéria, Sinéa e Rose, pelo amor, compreensão, fé e apoio moral nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Armi Wanderley da Nobrega, pela orientação desta tese.

À direção do INCQS, chefias de departamento e de laboratório que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Mychelle Alves Monteiro, Mararlene Ulberg Pereira, Rosana Gomes Ferreira, Rafaela Pinto da Costa, Tatiana Ávila Cruz, Adélia Mara Belém Lima e Marcus Antônio Araújo Jr, atuais e ex-colaboradores do laboratório, pela amizade, paciência e auxílio em diversas atividades laboratoriais.

À Dra. Silvana do Couto Jacob, sempre presente e atuante, pelo apoio e estímulo.

Ao grande amigo Márcio Labastie (*in memoriam*) pelo enorme incentivo.

À colaboração inestimável de André Luís Mazzei Albert, amigo e grande profissional, sempre pronto a auxiliar nos mais diversos problemas analíticos encontrados.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS pela oportunidade do convívio e absorção de conhecimentos e experiências durante as disciplinas dos créditos teóricos.

A todos os funcionários da Biblioteca e do Serviço de Informática do INCQS, pela atenção e auxílio.

A todos os colegas do Departamento e demais amigos do INCQS.

Ao professor e amigo Dr. Claudio Cerqueira Lopes (DQA/IQ-UFRJ) pelo carinho e doação de padrões analíticos.

A Dorina Bodi, do *Federal Institute for Risk Assessment* (Berlim, Alemanha) e a Wolfgang Radeck do *The Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL)* (Berlim, Alemanha), pela doação do padrão de senduramicina, não disponível comercialmente.

Aos colegas da Agência Francesa de Segurança Sanitária de Alimentos (AFSSA) (Fougères, França) Pascal Sanders, Eric Verdon e Murielle Gaugain-Juhel e do *Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI)* (Belfast, Irlanda do Norte), Glenn Kennedy, pela troca de informações e esclarecimento de diversas dúvidas na área de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos.

Ao CNPQ e FINEP pelo apoio financeiro aos projetos.

À todos aqueles que não foram citados e que colaboraram na execução deste trabalho.

“A diferença entre o impossível e o possível está na determinação de uma pessoa”.

Tommy Lasorda

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de resíduos de quatro classes de antibióticos em dois relevantes produtos de origem animal da dieta da população brasileira: ovos (ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas) e leite (tetraciclina). Ainda não havia dados disponíveis sobre a incidência de resíduos das classes mencionadas em ovos no Brasil. Os programas nacionais de monitoramento não investigam a presença desses medicamentos veterinários em ovos e não incluem o leite pasteurizado como matriz de análise. A relevância da pesquisa no âmbito da saúde pública deve-se à toxicidade cardiovascular dos ionóforos, ao risco de teratogenicidade de algumas tetraciclina e à contribuição ao surgimento de microorganismos resistentes devido ao uso em larga escala de produtos veterinários à base dos antimicrobianos estudados. As metodologias analíticas foram desenvolvidas, validadas e aplicadas a uma centena de amostras de leite pasteurizado e de ovos adquiridos na região metropolitana do Rio de Janeiro. A alta sensibilidade da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM) permitiu a detecção de ionóforos em ovos com uma frequência de 25%, com a salinomicina sendo identificada em 21% dos casos. Entretanto, o índice de resultados não-conformes foi de somente 2%. A lincosamida lincomicina e o macrolídeo tilosina foram detectados em níveis de traços em 4 e 1% dos ovos avaliados, respectivamente. Nenhum caso de contaminação por lasalocida, claritromicina e eritromicina foi verificado. Embora a incidência de resíduos de coccidiostáticos acima dos limites permitidos tenha sido pequena, os resultados indicam falhas no atendimento às Boas Práticas Veterinárias por parte de alguns produtores. Em relação ao leite, 14% das amostras apresentaram traços de oxitetraciclina, mas nenhuma foi não-conforme. Esses resultados demonstram que a população da região metropolitana do Rio de Janeiro não está exposta a níveis prejudiciais de resíduos de tetraciclina pela ingestão de leite pasteurizado. Os dados obtidos serão utilizados futuramente na avaliação da exposição alimentar a resíduos desses fármacos, contribuindo assim nas ações de Vigilância Sanitária.

Palavras-chave: Resíduos de medicamentos veterinários. Ionóforos poliéteres. Macrolídeos. Lincosamidas. Tetraciclina. Ovos. Leite. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the occurrence of residues of four classes of antibiotics in two relevant animal origin products from the Brazilian diet: eggs (polyether ionophores, macrolides and lincosamides) and milk (tetracyclines). There was still no available data on the incidence of residues of the referred classes in eggs in Brazil. The national monitoring programs do not check for those veterinary drugs in eggs and do not include pasteurized milk as a matrix of analysis. The relevance of research within the scope of the public health relies on the cardiovascular toxicity of ionophores, on the risk of teratogenicity of some tetracyclines and on the contribution to the emergence of resistant microorganisms due to widespread use of veterinary products based on the studied antimicrobials. The analytical methodologies were developed, validated and applied to a hundred samples of pasteurized milk and eggs purchased in the metropolitan area of Rio de Janeiro. The high sensitivity of the technique High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) allowed the detection of ionophores in eggs at a rate of 25%, with salinomycin being identified in 21% of cases. However, the rate of non-compliant results was only 2%. The lincosamide lincomycin and the macrolide tylosin were detected at trace levels in 4 and 1% of the analyzed eggs, respectively. No lasalocid, clarithromycin and erythromycin contamination case was found. Notwithstanding the incidence of coccidiostats residues above the permitted limits has been small, the results indicate failures in meeting the Veterinary Good Practices by some producers. Regarding milk, 14% of samples showed traces of oxytetracycline, but anyone was non-compliant. These results evidence that people from the metropolitan area of Rio de Janeiro are not exposed to harmful levels of tetracyclines residues by the intake of pasteurized milk. Obtained data will be used in future assessment of dietary exposure to residues of these drugs, thus contributing to Health Surveillance actions.

Keywords: Residues of veterinary drugs. Polyether ionophores. Macrolides. Lincosamides. Tetracyclines. Eggs. Milk. Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura dos antibióticos ionóforos poliéteres: (a) lasalocida, (b) monensina, (c) maduramicina, (d) senduramicina, (e) narasina, (f) salinomicina, (g) nigericina.	52
Figura 2	Complexação de íons sódio pela monensina.	53
Figura 3	Estrutura dos antibióticos macrolídeos estudados: (a) eritromicina, (b) claritromicina, (c) tilosina.	54
Figura 4	Estrutura da lincosamida estudada: lincomicina.	55
Figura 5	Estrutura das tetraciclinas. ^(a) Os 4-epímeros da OTC, TC e CTC diferem das substâncias originais porque o hidrogênio no carbono 4 está na direção oposta ao grupo dimetilamino. ^(b) DMC é geralmente empregada como padrão interno.	56
Figura 6	Modelo antigo de avaliação dos dados de resíduos e recomendação de LMRs pelo JECFA. F = razão do resíduo marcador em relação ao resíduo total. Adaptado de FAO/WHO (2006b).	58
Figura 7	Modelo atual de avaliação dos dados de resíduos e recomendação de LMRs pelo JECFA, já considerando a Ingestão Diária Estimada (IDE), derivada da mediana dos valores de concentração nos tecidos. Adaptado de FAO/WHO (2006a).	59
Figura 8	Relação entre o LMR e a concentração mediana usada para o cálculo da Ingestão Diária Estimada. Adaptado de FAO/WHO (2006a).	60

Figura 9	Método de Extração 1 – Fortificação no início do procedimento.	81
Figura 10	Método de Extração 3 – Fortificação no início do procedimento.	82
Figura 11	Método de Extração 5 – Fortificação no início do procedimento.	83
Figura 12	Espectro de massas de uma mistura dos analitos estudados, exceto a senduramicina. Solução a 50 ng/mL no solvente MeOH:NaOAc 2 mmol/L e 1% FOA, 80:20, v/v). A senduramicina foi otimizada individualmente, pois o padrão só foi recebido após os demais.	89
Figura 13	Espectro de massas da maduramicina em solução a 100 ng/mL em NaOAc 2 mmol/L e MeOH (20:80, v/v).	91
Figura 14	Espectro de massas da maduramicina em solução a 100 ng/mL em NH ₄ OAc 2 mmol/L e MeOH (20:80, v/v).	91
Figura 15	Espectro de massas da maduramicina em solução a 100 ng/mL em NH ₄ OAc 2 mmol/L com FOA 0,1% e MeOH (20:80, v/v).	92
Figura 16	Injeção de solução a 0,5 ng/mL (em MeOH:NaOAc 2 mmol/L e 1% FOA, 80:20, v/v), em coluna Polaris [®] C18-A, com fase móvel consistindo de 0,1% FOA em H ₂ O com 2 mmol/L de NaOAc:0,1% FOA em ACN (10:90, v/v).	94
Figura 17	Comparação dos melhores métodos obtidos com 0,1% FOA na fase móvel.	95
Figura 18	Comparação dos melhores métodos obtidos com 2% HOAc na fase móvel.	95

Figura 19	Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 1.	100
Figura 20	Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 3.	101
Figura 21	Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 4.	101
Figura 22	Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 5.	102
Figura 23	Perfil de estabilidade da LAS no solvente de reconstituição (pH 3).	103
Figura 24	Perfil de estabilidade da MAD no solvente de reconstituição (pH 3).	103
Figura 25	Perfil de estabilidade da SAL no solvente de reconstituição (pH 3).	103
Figura 26	Perfil de estabilidade da MON no solvente de reconstituição (pH 3).	103
Figura 27	Perfil de estabilidade da NAR no solvente de reconstituição (pH 3).	103
Figura 28	Perfil de estabilidade da SEN no solvente de reconstituição (pH 3).	103
Figura 29	Perfil de estabilidade da NIG no solvente de reconstituição (pH 3).	104
Figura 30	Perfil de estabilidade da LAS em diversos valores de pH.	105
Figura 31	Perfil de estabilidade da MAD em diversos valores de pH.	106
Figura 32	Perfil de estabilidade da SEN em diversos valores de pH.	107

Figura 33	Espectros de EM/EM do leite empregado na validação do método (leite orgânico) apresentando as transições da OTC e 4-EOTC e comprovando tratar-se de amostra isenta das substâncias a serem analisadas.	109
Figura 34	Gráfico das curvas de calibração efetuadas em três dias diferentes para a 4-epiclortetraciclina ajustadas pelo MMQP.	110
Figura 35	Gráfico das curvas de calibração na matriz início, final e controle para a 4-epiclortetraciclina ajustadas pelo MMQP.	112
Figura 36	Gráfico de Pareto para o analito demeclociclina (DMC).	114
Figura 37	Gráfico de Pareto para o analito doxiciclina (DC).	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).	32
Tabela 2	Informações sobre produtos de uso veterinário à base de macrolídeos para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).	39
Tabela 3	Informações sobre produtos de uso veterinário à base de lincosamidas para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).	42
Tabela 4	Identificação dos ionóforos poliéteres	53
Tabela 5	Identificação da lincosamida e dos macrolídeos usados nesta tese.	55
Tabela 6	Identificação das tetraciclinas.	55
Tabela 7	Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para ionóforos poliéteres adotados por diferentes autoridades regulatórias.	62
Tabela 8	Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.	64
Tabela 9	Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para lincosamidas e macrolídeos estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.	68
Tabela 10	Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.	70
Tabela 11	Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para tetraciclinas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.	73
Tabela 12	Gradiente 8.	93
Tabela 13	Gradiente obtido pela modificação do gradiente 8.	96

Tabela 14	Estimativa dos limites de detecção (LOD, S/N=3) e limites de quantificação (LOQ, S/N=10) do sistema CLAE-EM/EM nas condições analíticas descritas na seção 3.1.1.10.	97
Tabela 15	Resumo dos resultados obtidos com os métodos de extração testados.	99
Tabela 16	Identificação dos solventes em função de sua composição.	104
Tabela 17	Matriz do planejamento composto central para avaliação da robustez do método.	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abef	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>APCI</i>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> , Ionização Química à Pressão Atmosférica
Apex	Agência Brasileira de Promoção da Exportação e Investimentos
CC α	Limite de decisão
CC β	Capacidade de detecção
<i>CCRVDF</i>	<i>Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food</i> , Comitê do Codex Alimentarius sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos
<i>CFR</i>	<i>Code of Federal Regulation</i> , Código de Regulamentação Federal dos EUA
CLA	claritromicina
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
CVMP	<i>Committee for Veterinary Medicinal Products</i> , Comitê de Produtos Medicinais Veterinários da União Européia
DCR	Doença Respiratória Cônica
EFS	Extração por Fase Sólida
<i>EFSA</i>	<i>European Food Safety Authority</i> , Autoridade de Segurança Alimentar Européia
ELL	Extração Líquido-Líquido
<i>EMA</i> , antigo <i>EMEA</i>	<i>European Medicines Agency</i> , Agência Européia para a Avaliação de Medicamentos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ERI	eritromicina
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , Ionização <i>Electrospray</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agência Americana para Alimentos e Medicamentos
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i> , Serviço de Inspeção e Segurança dos Alimentos do Departamento de Agricultura dos EUA
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDE	Ingestão Diária Estimada
IDTM	Ingestão Diária Teórica Máxima
JECFA	<i>Joint FAO/WHO of Expert Committee on Food Additives</i> , Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes
LAS	lasalocida
LIN	lincomicina
LMDR	Limite Mínimo de Desempenho Requerido
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LVL	<i>Lowest Validation Level</i> , menor nível de validação de um método analítico
MAD	maduramicina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia

MON	monensina
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Monitoramento de Reações Múltiplas
NAR	narasina
NIG	nigericina
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i> , Nível sem Efeitos Observados
OIE	Organização Mundial para a Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCR	Plano Nacional de Controle de Resíduos
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite
SAL	salinomicina
SEN	senduramicina
SIBRATEC	Sistema Brasileiro de Tecnologia
TIL	tilosina
TIS	<i>TurbolonSpray™</i> , tipo de fonte de ionização ESI
UAT	Ultra-alta temperatura, equivalente a <i>UHT</i>
UBABEF, antiga UBA	União Brasileira de Avicultura
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> , Departamento de Agricultura dos EUA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Prefácio	24
1.2 Apresentação	25
1.3 Produção, comércio e consumo de ovos	28
1.4 Produção, comércio e consumo de leite	29
1.5 Uso dos ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas na avicultura	31
1.6 Uso das tetraciclinas na bovinocultura de leite	47
1.7 Mecanismo de ação e toxicidade dos ionóforos poliéteres	47
1.8 Mecanismo de ação e toxicidade dos macrolídeos	49
1.9 Mecanismo de ação e toxicidade das lincosamidas	50
1.10 Mecanismo de ação e toxicidade das tetraciclinas	50
1.11 Natureza dos ionóforos poliéteres	51
1.12 Natureza dos macrolídeos e lincosamidas	54
1.13 Natureza das tetraciclinas	55
1.14 O processo de Avaliação de Risco de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos	56
1.15 Avaliação e gestão de riscos referentes aos ionóforos poliéteres em aves	61
1.16 Avaliação e gestão de risco referentes aos macrolídeos e lincosamidas em aves	68
1.17 Avaliação e gestão de risco referentes às tetraciclinas em bovinos de leite	73
2 OBJETIVOS	75
3 MATERIAL E MÉTODOS	76
3.1 Desenvolvimentos das metodologias analíticas	76
3.1.1 Ionóforos poliéteres	76
3.1.1.1 Padrões	76
3.1.1.2 Solventes e Reagentes	77
3.1.1.3 Materiais	77
3.1.1.4 Equipamentos	77
3.1.1.5 Preparo de soluções-estoque	78
3.1.1.6 Preparo de soluções intermediárias e soluções de trabalho	78

3.1.1.7 Otimização do espectrômetro	78
3.1.1.8 Estudos de ionização da maduramicina no modo de ionização <i>Electrospray</i>	78
3.1.1.9 Estudos de desenvolvimento do método cromatográfico	79
3.1.1.10 Estudos preliminares de linearidade e sensibilidade do sistema CLAE-EM/EM	79
3.1.1.11 Preparo de amostras	80
3.1.1.12 Procedimentos de extração/purificação testados	80
3.1.1.13 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres no solvente de reconstituição preliminar	83
3.1.1.14 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres em diferentes valores de pH	84
3.1.2 Tetraciclinas	84
3.1.2.1 Padrões	84
3.1.2.2 Solventes e Reagentes	84
3.1.2.3 Materiais	84
3.1.2.4 Equipamentos	85
3.1.2.5 Preparo de soluções-estoque	85
3.1.2.6 Preparo de soluções intermediárias e soluções de trabalho	85
3.1.2.7 Otimização do espectrômetro	85
3.1.2.8 Preparo de amostras	85
3.1.2.9 Estudos de desenvolvimento e validação	86
3.2 Amostragem	86
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1 Ionóforos poliéteres	87
4.1.1 Estudos de ionização da maduramicina no modo de ionização <i>Electrospray</i>	87
4.1.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (estudos de desenvolvimento do método cromatográfico)	92
4.1.3 Avaliação preliminar de linearidade e sensibilidade do sistema CLAE-EM/EM	96
4.1.4 Procedimentos de extração/purificação	97
4.1.5 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres no solvente inicialmente escolhido para a reconstituição dos extratos	102

4.1.6 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres em diferentes valores de pH	104
4.2 Tetraciclinas	108
4.2.1 Seletividade	108
4.2.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho (função de calibração)	109
4.2.3 Linearidade e sensibilidade (incluindo efeito matriz)	110
4.2.4 Acurácia (exatidão e recuperação)	112
4.2.5 Precisão (repetitividade, precisão intermediária e análise de MRC)	113
4.2.6 Robustez	113
4.2.7 Limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidades de detecção ($CC\beta$)	115
4.2.8 Estudos de estabilidade	115
5 CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS	118
APÊNDICE A – Manuscrito 1: SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e Contaminantes Químicos em Alimentos de Origem Animal no Brasil: Histórico, Legislação e Atuação da Vigilância Sanitária e Demais Sistemas Regulatórios. <i>Rev. C. S. Col.</i> , v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.	128
APÊNDICE B – Manuscrito 2: SPISSO, B. F.; ARAÚJO JR, M. A. G.; MONTEIRO, M. A.; LIMA, A. M. B.; PEREIRA, M. U.; LUIZ, R. A.; NÓBREGA, A. W. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. <i>Anal. Chim. Acta</i> , v. 656, n.1-2, p. 72-84, 2009.	

- APÊNDICE C – Manuscrito 3: SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. A.; COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; NÓBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Anal. Chim. Acta*, v. 682, n. 1-2, p. 82-92, 2010 (submetido em maio de 2010). 166
- APÊNDICE D – Manuscrito 4: SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. *Food Addit. Contam. B*, v. 3, n. 4, p. 212-219, 2010 (submetido em maio de 2010). 178
- APÊNDICE E – Manuscrito 5: SPISSO, B. F.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. *Food Addit. Contam. B*, v. 3, n. 4, p. 220-227, 2010 (submetido em maio de 2010). 188

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prefácio

A presente tese foi formatada como coletânea de artigos científicos. Uma parte da seção INTRODUÇÃO, referente à história e bases legais da Vigilância Sanitária e demais sistemas regulatórios relacionados ao tema resíduos e contaminantes em alimentos no Brasil foi objeto de manuscrito publicado na revista *Ciência e Saúde Coletiva* (Apêndice A), da Associação Brasileira de Pós-Graduação em Saúde Coletiva (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

As seções referentes a MATERIAIS E MÉTODOS e RESULTADOS E DISCUSSÃO são apresentadas sob a forma de manuscritos, os quais se encontram nos APÊNDICES. Assim, somente experimentos não publicados ou publicados sem um maior detalhamento são apresentados nas páginas 76 a 115. A seção CONCLUSÕES contém uma avaliação global, uma vez que as conclusões específicas estão inseridas no corpo de cada artigo científico.

Os manuscritos estão apresentados da seguinte forma:

Apêndice A: SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e Contaminantes Químicos em Alimentos de Origem Animal no Brasil: Histórico, Legislação e Atuação da Vigilância Sanitária e Demais Sistemas Regulatórios. *Rev. C. S. Col.*, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

Apêndice B: SPISSO, B. F.; ARAÚJO JR, M. A. G.; MONTEIRO, M. A.; LIMA, A. M. B.; PEREIRA, M. U.; LUIZ, R. A.; NÓBREGA, A. W. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Anal. Chim. Acta*, v. 656, n. 1-2, p. 72-84, 2009.

Apêndice C: SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. A.; COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; NÓBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Anal. Chim. Acta*, v. 682, n. 1-2, p. 82-92, 2010 (submetido em maio de 2010).

Apêndice D: SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether

ionophores, macrolides and lincosamides residues. *Food Addit. Contam. B*, v. 3, n. 4, p. 212-219, 2010 (submetido em maio de 2010).

Apêndice E: SPISSO, B. F.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. *Food Addit. Contam. B*, v. 3, n. 4, p. 220-227, 2010 (submetido em maio de 2010).

Os manuscritos foram reproduzidos com permissão da Associação Brasileira de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, ABRASCO (Anexo A), Elsevier (Anexos B e C) e Taylor & Francis (Anexos D e E).

1.2 Apresentação

Como descrito no artigo constante do Apêndice A, no Brasil, até recentemente, não havia políticas de médio e longo prazo visando organizar e adequar os sistemas de regulamentação e controle de uso de medicamentos veterinários, bem como de controle de resíduos (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) compete o registro, a fiscalização e o controle dos produtos de uso veterinário e aditivos para produtos destinados à alimentação animal, bem como a prévia fiscalização sob o ponto de vista industrial e sanitário dos produtos de origem animal. Pelo termo “aditivo” entende-se

“substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não é utilizado normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios, atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano” (BRASIL, 2004; 2009a).

Os aditivos são subdivididos em cinco categorias, de acordo com suas funções e propriedades: aditivos tecnológicos, aditivos sensoriais, aditivos nutricionais, aditivos zootécnicos e anticoccidianos. Os antibióticos são empregados como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho, ou seja, substâncias que melhoram os parâmetros de produtividade, e também como anticoccidianos, substâncias destinadas a eliminar ou inibir protozoários (BRASIL, 2004; 2009a).

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cabe a responsabilidade do estabelecimento de limites de resíduos e contaminantes, além do controle e fiscalização sanitária dos alimentos ofertados para consumo da população, incluindo os alimentos de origem animal processados. Considerando que as ações de Vigilância Sanitária compreendem, além dos instrumentos da legislação e da fiscalização e controle sanitário de produtos, serviços e ambientes, a comunicação e as atividades de educação sanitária, torna-se evidente que nessa área de tanta superposição de atividades a efetividade das ações só pode ser atingida com a presença e interação de todos os atores envolvidos. Grandes avanços têm sido observados nessa área. Políticas públicas relacionadas à produção e qualidade vêm sendo implementadas, como por exemplo, investimentos na Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), criada para atender aos requisitos da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), que definiu novos parâmetros de qualidade para o leite brasileiro, incluindo a pesquisa de resíduos de antibióticos como procedimento específico para o controle de qualidade da matéria-prima. Um convênio entre o MAPA e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) previa a liberação de R\$12 milhões até 2009, sendo que R\$10 milhões deveriam ser usados somente para a compra de equipamentos (EMBRAPA, 2008a). A modernização da infra-estrutura dos laboratórios visando o monitoramento da qualidade e inocuidade do leite, além da capacitação dos profissionais são somente alguns dos diversos desafios a serem enfrentados. Um projeto de ampliação das funções da RBQL, com uma mudança do perfil, vem sendo discutido, de forma a criar um programa de análise de rebanhos leiteiros no Brasil nos moldes de um programa canadense. Esse programa visa não somente análises de monitoramento, mas também a gestão dos rebanhos, incluindo o acompanhamento das propriedades nas questões de nutrição, reprodução e sanidade animal, de forma a possibilitar a rastreabilidade na cadeia produtiva do leite (EMBRAPA, 2008c).

Neste contexto, o Governo de Minas Gerais, maior produtor nacional de leite, criou o Pólo de Excelência em Leite e Derivados, abrangendo as regiões da Zona da Mata e Campo das Vertentes. Esse pólo tem como principais ações a implementação de três programas: um Programa de Marketing Promocional, com o desenvolvimento de um Portal do Pólo do Leite, visando facilitar a comunicação e a realização de negócios entre os agentes do sistema agroindustrial do leite; um Programa de Formação e Capacitação de recursos humanos visando provocar um

salto de qualidade no setor; e um Programa Mineiro de Estruturação do Setor Lácteo para Exportação, a fim de aprimorar a qualidade para aumentar a participação no mercado internacional (LEITE et al., 2008).

Também na avicultura de postura estratégias vêm sendo propostas para o aprimoramento do setor. Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA), que em processo de fusão recente com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (Abef) gerou a UBABEF, está sendo desenvolvido um Sistema de Gestão da Qualidade específico para o segmento de ovos e ovo-produtos, a fim de atender às exigências de qualidade e rastreabilidade para a conquista de novos mercados. Ações em duas áreas específicas vêm sendo desenhadas: na área técnica, com questões relativas à sanidade, qualidade, produção animal e certificações; e na área comercial, subdividida em inteligência comercial (para identificar e incrementar mercados) e promoção comercial. Um novo projeto setorial, nos moldes do já existente para a carne de frango, está sendo elaborado junto à Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos (Apex), a fim de estimular as exportações brasileiras de ovos. Esse projeto prevê recursos para a elaboração de material promocional, divulgação do produto em eventos internacionais e a criação de uma marca própria para o mercado externo, a *Brazilian Egg* (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2010a, 2010b).

Em setembro de 2008, a criação pelo MAPA e Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) da Rede de Resíduos e Contaminantes (Rede de Laboratórios de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal e vegetal destinados ao consumo direto e indireto) foi um marco na estruturação de uma política interministerial e a longo prazo nessa área. Essa Rede integra o Sistema Brasileiro de Tecnologia – SIBRATEC – no componente Serviços Tecnológicos e foi idealizada com um prazo de seis anos, renovável automaticamente por igual período. Diversas instituições de pesquisa e organizações sociais, vinculadas ao MAPA, Ministério da Saúde, Ministério da Educação e Cultura e MCT estão representadas (BRASIL, 2008b).

Em outubro de 2008, esse acordo de cooperação mútua entre o MCT e o MAPA possibilitou a realização de uma chamada pública para apoiar atividades de pesquisa científica, tecnológica e de inovação que contribuíssem para as ações de Defesa Agropecuária (Edital CNPq/MAPA/SDA N° 064/20 08). A qualidade e inocuidade de produtos de origem animal foi uma das áreas englobadas.

1.3 Produção, comércio e consumo de ovos

Segundo os dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), em 2007 a China foi a maior produtora de ovos, responsável por 41% da produção mundial. Em segundo lugar ficou os EUA, seguido da Índia, Japão, México e Rússia, enquanto o Brasil ocupou o sétimo lugar. A produção do país atingiu 1.858 mil toneladas métricas, um pouco mais de um terço da alcançada pelos EUA, mas muito distante da obtida pela China, 25.654 mil toneladas métricas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2009).

De acordo com os dados divulgados em março de 2010 pelo IBGE, a produção nacional de ovos de galinha em 2009 apresentou um aumento de 3,4% em relação ao ano anterior, atingindo 2.359.810 mil dúzias, segundo pesquisa efetuada apenas em estabelecimentos com 10.000 ou mais galinhas poedeiras. Nesse ano, os estados que concentraram a maior produção foram São Paulo (com 30,6% do total nacional, mais do que toda a região Sul, a segunda maior produtora depois da região Sudeste), Minas Gerais (com 12,7%) e Paraná (com 9,5%). O estado de Mato Grosso apresentou um crescimento de 63,0% em relação a 2008 (IBGE, 2010). Os municípios que mais se destacam na produção de ovos de galinha são Bastos (SP), Santa Maria de Jetibá (ES) e Itanhandu (MG) (IBGE, 2008).

A participação do Brasil como exportador mundial de ovos ainda é tímida, mas as exportações do produto vêm crescendo desde 2004. Embora tenha havido crescimento da produção em 2009, com 45,3 mil toneladas embarcadas e um faturamento de US\$78,5 milhões, houve uma queda de 7,3% no faturamento, devido aos baixos preços no mercado internacional. As perspectivas são melhores para 2010. Os principais compradores do ovo brasileiro são os Emirados Árabes Unidos (comprando 48% da produção exportada), seguido da Venezuela e Angola (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2010b).

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA), em 2009 o consumo per capita de ovos no Brasil foi o mesmo de 2008, 120 unidades. Isso representa uma redução em relação às 132 unidades do ano de 2007 e às 142 unidades do ano de 2006, o que já posicionava o Brasil bem abaixo de países como o México (375 unidades), o Japão (347 unidades) e os Estados Unidos (258 unidades). Mesmo na América Latina, não estamos entre os maiores consumidores. (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, 2010; QUEVEDO, 2009). Diversos fatores foram citados por Santos Filho et al. (2010) para o baixo consumo nacional do produto: tabus e

preconceitos que ainda persistem, seja em relação a problemas de saúde ou ao fato do ovo ser visto como alimento para classes menos favorecidas; a baixa renda per capita da população (o que faz com que a participação na dieta de produtos industrializados à base de ovos, com maior valor agregado - incluindo-se massas de qualidade - seja pouco significativa); hábitos alimentares diferenciados em relação aos países que figuram na lista de maiores consumidores e à reduzida organização desse segmento do setor produtivo, quando comparado ao setor de carnes. Diferenças regionais de consumo também foram observadas, com a região Sul apresentando o maior consumo e as regiões mais pobres o menor, embora o ovo seja uma fonte barata de proteína animal. Entretanto, as perspectivas são de aumento no consumo.

Não existem dados disponíveis sobre a industrialização do ovo no Brasil, mas segundo Rami (2009), estima-se que 4 a 5% dos ovos produzidos sejam processados pela indústria de ovos para a obtenção de ovoprodutos.

1.4 Produção, comércio e consumo de leite

Os últimos dados da FAO, que datam de 2007, indicam que o Brasil ficou na sétima posição entre os maiores produtores mundiais de leite bovino, após a Índia, os Estados Unidos, a China, o Paquistão, a Rússia e a Alemanha. Entretanto, a produção nacional não chegou a um terço das 84.189 mil toneladas atingidas pelos EUA (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2009). Segundo a mesma organização, em 2009, a produção mundial de leite e produtos lácteos atingiria 709,7 milhões de toneladas métricas. As previsões indicavam que essa produção se concentraria no continente asiático (36,1%), europeu (30,8%) e americano (24,5%) e que o Brasil ocuparia o quinto lugar no ranking liderado pela União Européia (com 27 países membros), seguida da Índia, Estados Unidos e China (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2008).

As previsões do Departamento de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agriculture, USDA*) indicam que em 2010 o Brasil deverá produzir 30.235 mil toneladas métricas de leite fluido, enquanto que os EUA e a União Européia 85.230 mil e 134.000 mil toneladas métricas, respectivamente. Isso representa uma previsão de crescimento de 5% em relação a 2009, a maior em comparação ao esperado pela Argentina (2%) e Nova Zelândia (3%). EUA e Austrália deverão ter ligeira redução (-1%) e a União Européia deverá manter sua

produção. Apesar de possuir um dos maiores rebanhos de bovinos de leite do mundo (17.600 mil cabeças, estimativa para 2010), superior ao dos EUA (8.970 mil cabeças), mas inferior ao da União Européia (24.000 mil cabeças), a produtividade nacional (estimativa de 1,72 tonelada métrica por cabeça) ainda deverá ser bastante reduzida quando comparada a esses países, respectivamente 9,50 e 5,58 toneladas métricas por cabeça. A produção brasileira de leite em pó integral deverá atingir 518 mil toneladas métricas em 2010, sendo que 17 mil toneladas métricas deverão ser exportadas, praticamente a mesma quantidade exportada em 2009 (15 mil toneladas métricas, dados preliminares). A crise internacional no ano passado acarretou em um decréscimo de aproximadamente 82% em relação ao total de 83 mil toneladas métricas exportado em 2008 (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2009).

A produção de leite no país aumentou mais de 123% entre 1985 e 2007, enquanto o consumo per capita teve um crescimento de 47,8% no mesmo período, passando de 94 para 139 litros/habitante/ano, ainda bem abaixo dos 175 litros/habitante/ano recomendados pela Organização Mundial da Saúde. Esse excedente de produção possibilitou que a partir de 2004, o país se transformasse de importador para exportador líquido de lácteos (LEITE et al., 2008).

Segundo a Pesquisa Trimestral do Leite (IBGE, 2010), a industrialização nacional de leite cru ou resfriado por estabelecimentos sob inspeção sanitária federal, estadual e municipal no quarto trimestre de 2009 foi 11,9% superior ao terceiro trimestre do mesmo ano e 11,1% em relação ao mesmo trimestre de 2008. 19.493.130 mil litros foram industrializados no ano passado, principalmente por Minas Gerais (26,7%), Rio Grande do Sul (14,1%) e Goiás (12,4%). O leite em pó é o principal produto do Brasil no mercado externo de lácteos, e o volume exportado sofreu uma queda de 76,3% no último trimestre de 2009 em relação ao mesmo período de 2008. A valorização do real perante o dólar desestimula as exportações e incentiva as importações, mantendo o produto no mercado interno a preços satisfatórios. Embora as exportações de leite em pó sejam muito maiores que as de leite *in natura*, estas vêm crescendo significativamente. Em 2007 os municípios com a maior produção em volume foram Castro (PR), com 135,67 milhões de litros (0,5% do total), Pompeu (MG), com 108,91 milhões de litros e Marechal Cândido Rondon (PR) com 106,0 milhões de litros (IBGE, 2008).

1.5 Uso dos ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas na avicultura

Os ionóforos poliéteres são antibióticos produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* e representam hoje os agentes anticoccidianos mais empregados na avicultura de corte, mas não são autorizados na avicultura de postura. São adicionados às rações para a prevenção da coccidiose, a principal doença contagiosa parasitária em aves domésticas causada por protozoários do gênero *Eimeria spp.*, que pode causar grandes prejuízos econômicos devido à perda de eficiência do lote (coccidiose subclínica) e à alta taxa de mortalidade (coccidiose clínica). Cada tipo de ave pode ser infectado por diferentes espécies de *Eimeria*, que são hospedeiro-específicas e de variada patogenia (ANADON; LARRAÑAGA, 1999). A vacinação como medida de prevenção não tem sido muito utilizada, pois é menos eficaz que o uso de anticoccidianos, que são empregados de forma alternada a fim de contornar a questão da resistência. Os sintomas da coccidiose em aves domésticas são diarreia com sangue, alta mortalidade, redução na ingestão de ração e água, emagrecimento e perda da produção de ovos.

Além das aves domésticas, os ionóforos poliéteres são empregados na prevenção e tratamento da coccidiose em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e coelhos. Também atuam como promotores de crescimento em bovinos e suínos, melhorando a eficiência alimentar e a taxa de ganho de peso (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008). Em ruminantes são empregados ainda para aumentar a produção de leite em vacas em lactação (LINDSEY; BLAGBURN, 1995).

Existem seis ionóforos poliéteres aprovados no Brasil, quatro para uso exclusivo em aves domésticas (lasalocida, maduramicina, narasina e senduramicina), um para uso em aves e bovinos (monensina) e um indicado para bovinos e suínos, além das aves domésticas (salinomina). A Tabela 1 apresenta as informações de uso dos aditivos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil, segundo o Compêndio de Produtos Veterinários (2010).

Tabela 1. Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Dosagem	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Lasalocida sódica	Avatec Premix 15%	4.506/93	Lasalocida sódica 15,0 g; trigoilho q.s.p 100,0 g	Prevenção da coccidiose em frango de corte causada por: <i>Eimeria acervulina</i> , <i>E. mivati</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. tenellae</i> , <i>E. brunetti</i> .	600 g/ton de ração, continuamente, para obter níveis ativos de 90 mg/kg (ppm) de lasalocida sódica na ração.	48 h	Deve-se suspender o uso 48 horas antes do abate das aves destinadas ao consumo humano. Manter fora do alcance de crianças e animais domésticos.	Alpharma do Brasil Ltda.
Maduramicina	Cygro Premix C	7.391/00	Maduramicina 1,0 g; álcool benzílico 4,0 g; óleo de milho refinado 3,3 g; gérmen de milho 100,0 g	Prevenção da coccidiose aviária.	500 a 600 g/ton de ração (equivalente a 5 a 6 mg/kg de maduramicina por kg de ração), desde o 1º dia de vida até 3 (três) dias antes do abate.	3 dias	Usar somente em ração de frangos de corte. Usar somente a dose recomendada. Não usar junto com outros agentes anticoccidianos. Usar equipamentos de proteção individual durante o manuseio.	Alpharma do Brasil Ltda.

Continuação da Tabela 1. Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Dosagem	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Monensina sódica	Avensin granular 40	SP-09492 30010	Monensina sódica 40%; carbonato de cálcio 60%	Prevenção da coccidiose em aves de corte causada por: <i>Eimeria acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. mitis</i> / <i>mivati</i> , <i>E. brunetti</i> .	250 a 300 g/ton de ração, para se obter uma concentração final de 100 a 120 ppm de monensina	5 dias	Não administrar a aves poedeiras (galinhas) e frangos acima de 16 semanas de idade. Não permitir o acesso a perus adultos, equinos e cães a rações com monensina, pois pode ser fatal. Incompatível com tiamulina. Não aprovado para ser utilizado com "binders" para pellets. Ao manipular o produto, usar equipamentos de proteção individual. Não contaminar lagos, cursos de água ou canais.	Phibro Saúde Animal Internacional Ltda.
Monensina sódica	Coban 200 Premix	2.641/87	Monensina 20 g; excipiente q.s.p. 100 g	Prevenção da coccidiose causada por <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. mivati</i> , <i>E. necatrix</i> e <i>E. brunetti</i> (frangos de corte e frangas de reposição) e por <i>E. meleagrimitis</i> , <i>E. adenoides</i> e <i>E. gallopavonis</i> (perus em crescimento).	500 a 600 g/ton de ração, continuamente, em frangos de corte e frangas de reposição (equivalente a 100 a 120 mg/kg de monensina) e 300 a 500 gramas em perus em crescimento (equivalente a 60 a 100 mg/kg de monensina).	não possui	Frangas de reposição: usar somente em aves destinadas à postura em gaiolas. Não administrar o produto à aves em postura. Perus: usar somente em perus até a 16ª semana de idade. Não usar em perus reprodutores. Não permitir o acesso de equídeos às rações contendo Coban 200 Premix. A ingestão de monensina por esses animais pode ser fatal.	Eli Lilly do Brasil Ltda.

Continuação da Tabela 1. Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Dosagem	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Monensina sódica	Coban 400 Premix	4.177/93	Monensina 40 g; excipiente q.s.p. 100 g	Prevenção da coccidiose causada por <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. mivati</i> , <i>E. necatrix</i> e <i>E. brunetti</i> (frangos de corte e frangas de reposição) e por <i>E. meleagrimitis</i> , <i>E. adenoides</i> e <i>E. gallopavonis</i> (perus em crescimento).	250 a 300 g/ton de ração, continuamente, em frangos de corte e frangas de reposição (equivalente a 100 a 120 mg/kg de monensina) e 150 a 250 gramas em perus em crescimento (equivalente a 60 a 100 mg/kg de monensina).	não possui	Frangas de reposição: usar somente em aves destinadas à postura em gaiolas. Não administrar o produto à aves em postura. Perus: usar somente em perus até a 16ª semana de idade. Não usar em perus reprodutores. Não permitir o acesso de equídeos às rações. A ingestão de monensina por esses animais pode ser fatal.	Eli Lilly do Brasil Ltda.
Monensina sódica Ácido 3-nitro, 4-hidroxifenilarsônico	Qualivet M	8.601/03	Ácido 3-nitro (ácido 3-nitro, 4-hidroxifenilarsônico) 9,08 g; monensina (na forma sódica) 18,00 g; excipiente q.s.p. 100 g	Auxiliar no tratamento da coccidiose em frangos de corte, causada por <i>Eimeria tenella</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. brunetti</i> e <i>E. mivati</i> .	Para frangos de corte: 500 g/ton de ração (equivalente a 45,4 ppm de ácido 3-nitro e 90 ppm de monensina).	5 dias	Não tratar poedeiras produzindo ovos e equídeos, pois pode ser fatal. A ração com o produto deve ser consumida em 30 dias. Não fumar, beber ou comer durante o manuseio e usar equipamento de proteção. Incompatível com tiamulina e oleandomicina. A permetrina, antibióticos macrolídeos e neomicina podem diminuir o metabolismo dos ionóforos, aumentando possíveis efeitos tóxicos.	M. Cassab Comércio e Indústria Ltda.

Continuação da Tabela 1. Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Dosagem	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Narasina	MontebanG 100 Premix	3.164/89	Narasina 10 g; excipiente q.s.p. 100 g	Prevenção da coccidiose causada por <i>E. necatrix</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. acervulina</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. mivati</i> e <i>E. máxima</i> e da enterite necrótica por <i>Clostridium perfringens</i> .	60 a 80 partes por milhão (ppm) de narasina / ton de ração.	Não requer	Não permitir que cavalos ou outros equídeos tenham acesso às formulações contendo Monteban G 100 Premix. A ingestão deste produto por esta espécie pode ser fatal. Não administrar Monteban G 100 Premix para galinhas em fase de postura ou para perus.	Eli Lilly do Brasil Ltda.
Narasina Nicarbazina	Maxiban 80/80 Premix	2.860/88	Narasina 8 g; N, N'-bis (4-Nitrofenil) uréia e 4-6-dimetil-2-pirimidinol 8 g; veículo q.s.p 100 g	Prevenção e controle da coccidiose causada por <i>Eimeria necatrix</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. acervulina</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. Mivati</i> e <i>E. maxima</i> em frangos de corte.	500 e 625 g/ton de ração para obter-se concentrações finais de 80 a 100 ppm.	10 dias	Não administrar o produto a galinhas poedeiras. Não permitir que perus, cavalos ou outros equídeos tenham acesso à ração com o produto, pois pode ser fatal para equídeos. Suspender a medicação 10 (dez) dias antes do abate das aves destinadas ao consumo humano. Ao misturar e manipular o premix, usar equipamentos de proteção.	Eli Lilly do Brasil Ltda.

Continuação da Tabela 1. Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Dosagem	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Salinomicina sódica	Bio-cox 120G	7633/01	Salinomicina sódica 12 g; carbonato de cálcio 100 g	Prevenção da coccidiose em frangos e frangas de reposição.	367 g a 550 g/ton de ração (equivalente a 44 a 66 mg/kg de salinomicina na ração).	n.d., mas segundo a bula não há período de carência	Usar somente as doses recomendadas. Não usar em ração para perus e equinos. Não usar simultaneamente com tiamulina. Não administrar às poedeiras.	Alpharma do Brasil Ltda.
Salinomicina sódica	Coxistac granular 24%	SP-09492 30009	Salinomicina sódica 24 g; carbonato de cálcio 76 g	Prevenção da coccidiose em aves de corte, causada por <i>Eimeria acervulina</i> , <i>E. máxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. mitis</i> / <i>mivati</i> , <i>E. brunetti</i> .	250 g/ton de ração (equivalente a 60 mg/kg de salinomicina na ração).	5 dias	Não administrar a aves poedeiras (galinhas) e frangos acima de 16 semanas de idade. Não permitir o acesso a perus adultos, equinos e cães a rações com salinomicina, pois pode ser fatal. Incompatível com a tiamulina. Não aprovado para ser utilizado com "binders" para pellets. Ao manipular o produto, usar equipamentos de proteção individual. Não contaminar lagos, cursos de água ou canais.	Phibro Saúde Animal Internacional Ltda.
Salinomicina sódica	Coxistac 12% granular	2.609/86	Salinomicina sódica micelial 12 g; excipientes q.s.p. 100 g	Prevenção da coccidiose em aves (frangos de corte)	500 g/ton de ração (equivalente a 60 mg/kg de salinomicina na ração).	n.d.	Não usar em poedeiras. Não usar na alimentação de outros animais. Incompatível com a tiamulina. Usar equipamentos de proteção individual.	Phibro Saúde Animal Internacional Ltda.

n.d. = não declarado.

Continuação da Tabela 1. Informações sobre aditivos coccidiostáticos à base de ionóforos poliéteres para frangos de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Dosagem	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Salinomicina Ácido 3-nitro, 4-hidroxifenilarsônico	Qualivet S	8.602/03	Ácido 3-nitro (ácido 3-nitro, 4-hidroxifenilarsônico) 9,00 g; salinomicina (na forma sódica) 8,40 g; excipiente q.s.p. 100 g	Auxiliar no tratamento da coccidiose em frangos de corte, causada por <i>Eimeria tenella</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. brunetti</i> e <i>E. mivati</i> .	500 g/ton de ração (45 ppm de ácido 3-nitro e 42 ppm de salinomicina).	5 dias	Não administrar a poedeiras produzindo ovos. Não pode ser consumida por equídeos, ruminantes, perus, hamsters e cães. Após adição, usar em 30 dias. Não fumar, beber ou comer durante o manuseio e usar equipamento de proteção individual. Pode ser associado com outras medicações normalmente utilizadas em avicultura, exceto tiamulina e oleandomicina.	M. Cassab Comércio e Indústria Ltda.
Senduramicina	Aviax Premix 5%	3.816/91	Senduramicina 5,00 g; excipiente q.s.p. 100,00 g	Prevenção e controle da coccidiose em frango de corte causada por <i>E. tenella</i> , <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. mivati</i> / <i>mitis</i> .	400 a 500g/ ton de ração para se obter 20 a 25ppm de senduramicina	Sem, segundo a bula; 5 dias, segundo a ficha técnica	Deve ser manipulado com segurança.	Phibro Saúde Animal Internacional Ltda.

As lincosamidas e os macrolídeos são antibióticos bacteriostáticos ou bactericidas, dependendo da concentração, e são usados na prevenção e no tratamento de doenças respiratórias, enterite bacteriana e na promoção do crescimento em frangos quando incorporados em níveis subterapêuticos na ração. Em aves domésticas a eritromicina é usada para tratar infecções respiratórias causadas por *Mycoplasma* e lincomicina para tratar enterite necrótica (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008; SPOO; RIVIERE, 1995). As Tabelas 2 e 3 apresentam informações sobre produtos de uso veterinário registrados no Brasil com macrolídeos e lincosamidas na sua formulação, respectivamente, destinados a aves de corte (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Informações sobre os produtos mais empregados no país não foram localizadas. Considerando que somos hoje o terceiro maior produtor mundial de carne de frango (após os EUA e China) e líder nas exportações, há um risco potencial de que rações destinadas à avicultura de postura possam conter resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas por contaminação cruzada com rações destinadas à avicultura de corte. Programas internacionais de monitoramento revelam que o risco existe, mas essa avaliação ainda não foi efetuada de forma sistematizada no país. Além disso, a não observância dos períodos de carência dos medicamentos registrados para aves poedeiras pode originar resíduos em níveis superiores aos considerados seguros.

Tabela 2. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de macrolídeos para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Tilmicosina	Pulmotil AC	7.177/99	Tilmicosina (fosfato) 25 g; veículo q.s.p. 100 mL	Para o tratamento e controle das infecções respiratórias causadas por <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Mycoplasma synoviae</i> , <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> , <i>Pasteurella multocida</i> e outros microrganismos sensíveis à tilmicosina. Diluído na água de bebida, dose diária de 15-20 mg/kg de peso corporal, durante 3 dias, a qual pode ser obtida pela adição de 0,3 mL do produto (equivalente a 75 mg de tilmicosina/L).	7 dias	Não permitir o acesso de cavalos e outros equinos à água contendo tilmicosina. Usar equipamentos e medidas de proteção ao manipular o produto. Em caso de contato acidental da pele ou dos olhos com o produto, lavá-los imediatamente com água em abundância.	Eli Lilly do Brasil Ltda.
Tilosina	Tylan G 250 Premix	4.734/94	Tilosina granulada (como fosfato) 25 g; excipiente q.s.p. 100 g	Frangos de Corte, frangas de reposição e poedeiras. Como auxiliar no controle da Doença Respiratória Crônica, causada por <i>Mycoplasma gallisepticum</i> : 3.520 a 4.400 g (equivalente a 880 a 1.100 g de atividade de tilosina) / ton de ração, durante os 5 primeiros dias de vida, repetindo a medicação, na mesma dosagem, durante 2 dias consecutivos entre a 3ª e a 5ª semana de vida das aves e/ou em outros períodos de stress. Para o tratamento da Enterite Necrótica causada por <i>Clostridium perfringen</i> : 400 g (equivalente a 100 g de atividade de tilosina) / ton de ração durante 7 dias consecutivos.	Na posologia de 880 a 1.100g de atividade de tilosina/ton de ração, não consumir a carne das aves durante o período de tratamento e até 5 dias após a última medicação. - Para as demais posologias, não requer período de carência.	Não usar em aves produtoras de ovos para consumo humano. A ração medicada deve ser utilizada num prazo máximo de 90 dias após o seu preparo. Não misturar o produto em rações contendo bentonita em níveis superiores a 2%. Ao misturar e manipular Tylan G 250 Premix, usar roupas protetoras, luvas impermeáveis e máscaras contra pó.	Eli Lilly do Brasil Ltda.

Continuação Tabela 2. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de macrolídeos para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Tilosina	Tylan Solúvel 100 G	1965/64	Tilosina (tartarato) 100 g	<p>Auxiliar no tratamento e controle da Doença Respiratória Crônica (DRC) das aves, causada por <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>M. synoviae</i>, na época de vacinação ou outros períodos de estresse. Para o tratamento da enterite necrótica das aves, causadas por <i>Clostridium perfringens</i>. Como preventivo da sinusite infecciosa dos perus, causada pelo <i>Mycoplasma gallisepticum</i>.</p> <p>Administrar por via oral, diluído na água de bebida, nas seguintes dosagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Frangos de corte: 1 g para cada 2 L, durante os três primeiros dias de vida (72 h), repetindo a medicação por 24 h na 3ª ou 4ª semana de vida. - Frangas de reposição: 1 g para cada 2 L, durante os três primeiros dias de vida (72 h), repetindo por 24 h na 3ª ou 4ª, na 8ª, na 16ª e na 20ª semanas de vida, para coincidir com vacinação ou outro estresse. - Para o tratamento de enterite necrótica: 1 g para cada 6, 7, 10 ou 20 L (equivalentes a 150 ou 100 ou 50 ppm, respectivamente), durante cinco dias consecutivos. - Como preventivo de sinusite infecciosa: 1 g para cada 2 L, durante os cinco primeiros dias de vida, repetindo por 48 h na 4ª semana de vida. 	24 h para frangos; 5 dias para perus	Não administrar o produto para aves produtoras de ovos destinados ao consumo humano.	Eli Lilly do Brasil Ltda.

Continuação Tabela 2. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de macrolídeos para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Tilosina	Tylan G 100 Premix	5950/97	Tilosina granulada (como fosfato) 10 g; excipiente q.s.p. 100 g	Frangos de Corte, Frangas de Reposição e Poedeiras. Como auxiliar no controle da Doença Respiratória Crônica, causada por <i>Mycoplasma gallisepticum</i> : 8.800 a 11.000 g (equivalente a 880 a 1.100 g de atividade de tilosina) / ton de ração.	5 dias	A ração medicada deve ser utilizada num prazo máximo de 90 dias após seu preparo.	Eli Lilly do Brasil Ltda.
Tilosina	Tylotrat SM	6593/98	Cada 100 mL contém 2,5 g de tilosina	Tratamento das complicações respiratórias de origem bacteriana: 20 mL em 1 L de água, diariamente, de 3 a 5 dias	n.d.	n.d.	A Química Santa Marina S.A.
Eritromicina Sulfametoxipiridazina Trimetoprim	Eriprim	0992	Eritromicina 4,4 g; sulfametoxipiridazina 8,5 g; lactato de trimetoprim 1,7 g; veículo q. s. p. 100,0 g	Doença Respiratória Crônica - DRC (causada por <i>E.coli</i> e <i>Mycoplasma spp</i>), Coriza Infeciosa (causada por <i>Haemophilus gallinarum</i>) e suas complicações (causadas por <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> e <i>E.coli</i>). Preventivo: Na ração: 2 g/kg de ração ou 50 g/25 kg de ração Na água: 1 g/L de água ou 50 g/50 L de água Curativo: Recomendado o uso através da água de bebida, na seguinte dosagem: 2 g/L ou 50 g/25 L nas primeiras 48 h, continuando o tratamento por mais 2 ou 3 dias, com 1g /L ou 50 g/50 L.	n.d.	Conservar em local fresco, seco e ao abrigo da luz solar, fora do alcance de crianças e animais domésticos.	Des-Far Laboratórios Ltda.

n.d. = não declarado.

Tabela 3. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de lincosamidas para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Lincomicina Gentamicina	Lincogen 2,2 X 2,2	6357/98	Lincomicina 2,2 g; gentamicina 2,2 g; excipiente q.s.p 100,0 g	Tratamento das infecções produzidas por <i>Mycoplasma spp.</i> (DCR); <i>E. Coli</i> (DCR Complicada); <i>Salmonella spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp</i> (enterites) Curativo: 1 kg/1000 L de água durante 5 dias, ou 120 mg/kg de peso corpóreo	Nas doses recomendadas não há riscos de haver resíduos detectáveis nos tecidos. Entretanto, recomenda-se suspender o tratamento 14 dias antes do abate para aves.	É recomendável continuar o tratamento por tempo não inferior a 48 h após o desaparecimento dos sintomas. As sobras e embalagens vazias devem ser acondicionadas em recipientes lacrados e descartados de forma segura evitando contaminar o meio ambiente.	Interchange Veterinária Indústria e Comércio Ltda.
Lincomicina	Lincomix® 600	2.110/84	Lincomicina base (cloridrato) 60,00 g; excipiente q.s.p. 100,00 g	Tratamento e controle da enterite necrótica causada ou complicada por <i>Clostridium spp.</i> 2,2 a 4,4 g de lincomicina (3,7 a 7,4 g de Lincomix® 600)/ton de ração como único alimento.	n.d.	Boas práticas de manufatura devem ser observadas no preparo do alimento contendo este medicamento, incluindo procedimentos apropriados de limpeza, a fim de se evitar contaminação cruzada.	Laboratórios Pfizer Ltda.
Lincomicina	Lincomix® Premix	1.001/79	Lincomicina base (cloridrato) 4,4 g; excipiente q.s.p. 100,0 g	Controle de enterite necrótica causada ou complicada por <i>Clostridium spp.</i> 2,2 a 4,4 g de lincomicina (50 a 10 g de Lincomix® Premix)/ton de ração como único alimento.	não requer	- Conservar em temperatura ambiente, armazenar as embalagens abertas em lugar seco para prevenir a formação de grumos. - Misturar completamente à ração antes do uso.	Laboratórios Pfizer Ltda.

n.d. = não declarado.

Continuação Tabela 3. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de lincosamidas para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Lincomicina	Lincosan 11%	6253/98	Cloridrato de lincomicina (equivalente a 10 g de base) 11 g; excipiente q.s.p. 100 g	Tratamento da doença crônica respiratória (DCR) causada por <i>Mycoplasma</i> spp e da enterite necrótica causada por Clostrídios spp em frangos de corte, reposição e postura. 2 kg do produto/ton de ração, durante 3 a 5 dias consecutivos.	6 dias Não explicita período de retirada para aves de postura.	- Conservar em local seco, à temperatura em torno de 30° C, fora da luz solar direta e do alcance de crianças. - Guardar o produto na embalagem original, restos do produto e embalagens vazias, eliminar com segurança evitando contaminar o meio ambiente.	Interchange Veterinária Indústria e Comércio Ltda.
Lincomicina	Lincosil	7144/99	Lincomicina (na forma de cloridrato) 4,4 g; excipiente q.s.p. 100,0 g	Prevenção e controle da enterite necrótica causada por <i>Clostridium perfringens</i> . Fase inicial: 4,4 g de lincomicina (100 g do produto)/ ton de ração. Fase final: 2,2 g de lincomicina (50 g do produto)/ ton de ração.	1 dia para aqueles que receberam até 110 g de lincomicina/ton de alimento e 6 dias para aqueles que receberam 220 g/ton.	Conservar em local fresco, seco e ao abrigo da luz solar. Efeitos colaterais mais frequentes: caibras, dores abdominais ou de estômago, distensão abdominal severa, diarreia aquosa e severa, febre, náuseas ou vômitos, cansaço ou debilidade não habituais. Não utilizar o produto em animais sensíveis ao medicamento. Não utilizar em espécies que não sejam aves e suínos, pois pode provocar efeitos gastrintestinais adversos. Observar boas práticas de manufatura para evitar contaminação cruzada.	Vansil Indústria Comércio e Representações Ltda.

Continuação Tabela 3. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de lincosamidas para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Lincomicina Espectinomomicina	Linco- Spectin® 100	7.652/01	Espectinomomicina (sulfato) 44,50 g; lincomicina (cloridrato) 22,20 g; benzoato de sódio (pó) 1,07 g; lactose monoidratada (pó) 100,00 g	Prevenção e tratamento de Doença Crônica Respiratória (DCR) causada por <i>Mycoplasma</i> spp e DCR Complicada associada com infecções micoplasmáticas e por coliformes suscetíveis à associação de Lincomicina e Espectinomomicina; na prevenção e no tratamento de aerossaculite causada por <i>M. meleagridis</i> (em perus com até 5 dias de idade). Administrar por via oral, diluído na água de bebida (1 frasco do produto para cada 120 L de água de bebida; 0,5 g de atividade antibiótica / 1 L), nas dosagens abaixo, devendo ser oferecida como única fonte de bebida até o consumo completo. Após, oferecer água não medicada pelo restante do dia. Prevenção de DCR em aves: 150 mg de atividade (50 mg de lincomicina + 100 mg de espectinomomicina)/kg de peso vivo / dia, durante os 3 a 5 primeiros dias de vida. Administrar 50 mg de atividade/kg de peso vivo / dia, durante 1 a 2 dias na 4ª semana de idade ou após a vacinação Tratamento de DCR em aves: 50 mg de atividade/kg de peso vivo / dia, aos primeiros sintomas da doença, e continuar por 3 a 7 dias. Perus: 150 mg de atividade/kg de peso / dia, durante os 3 a 5 primeiros dias de vida	Não requer	Não administrar em aves de postura.	Laboratórios Pfizer Ltda.

Continuação Tabela 3. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de lincosamidas para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Lincomicina Espectinomomicina	Linco- Spectin® 440	7.653/01	Espectinomomicina (sulfato tetraidratado) 22,0 g; lincomicina (cloridrato) 22,0 g; excipiente q.s.p. 100,0 g	Controle da mortalidade precoce associada a <i>Escherichia coli</i> . 88 g de atividade antibiótica/1000 kg de ração e oferecer como único alimento, durante 3 semanas.	não requer	Não administrar em aves de postura. - A embalagem aberta deve ser mantida em lugar fresco e seco. - Misturar completamente à ração antes do uso.	Laboratórios Pfizer Ltda.
Lincomicina Espectinomomicina	Linco- Spectin® Solução estéril	137/75	Cloridrato de lincomicina (equiv. à base) 50,00 mg; sulfato de espectinomomicina (equiv. à base) 100,00 mg; álcool benzílico 9,00 mg; água q.s.p. 1,00 mL	Tratamento de D.C.R. (Doença Crônica Respiratória) com ou sem infecções provocadas por <i>E. coli</i> . Os tratamentos com resultados altamente positivos incluem infecções por micoplasma, como D.C.R., aerosaculite e estafilocose aviária. 0,1 mL/0,5 kg de peso, por via subcutânea. Uma vez a cada 24 h por 3 dias consecutivos ou injetar de uma só vez e continuar o tratamento por via oral, durante 3 a 5 dias.	não requer	- Deve ser usado com prudência em animais com sensibilidade acentuada aos antibióticos. - Não deve ser administrado a coelhos, porquinhos da índia e chinchilas, por ter sido constatado que é prejudicial a estas espécies animais.	Laboratórios Pfizer Ltda.

Continuação Tabela 3. Informações sobre produtos de uso veterinário à base de lincosamidas para aves de corte registrados no Brasil (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Princípio ativo	Produto (nome comercial)	Nº Registro no MAPA	Fórmula	Indicações e dosagens	Período de carência	Precauções	Laboratório produtor/ Distribuidor/ Representante
Lincomicina Espectinomicina	Linco- Spectin® Premix	0005/75	Espectinomicina (sulfato) 2,2 g; lincomicina (cloridrato) 2,2 g; excipiente q.s.p. 100,0 g	Controle da mortalidade precoce associada a <i>Escherichia coli</i> . 88 g de atividade antibiótica/1000 kg de ração e oferecer como único alimento, durante 3 semanas.	Não requer	- A embalagem aberta deve ser mantida em lugar fresco e seco. - Misturar completamente à ração antes do uso.	Laboratórios Pfizer Ltda.
Lincomicina Espectinomicina	Spectolin	6.666/99	Lincomicina 5,00 g; espectinomicina 10,00 g; veículo q.s.p. 100,00 mL	Doença respiratória causada por <i>Mycoplasma spp.</i> 40 mg/kg, 0,25 mL/kg em 1 aplicação diária por 3 a 5 dias, por via intramuscular ou subcutânea.	7 dias	Não consumir os ovos das aves tratadas por um período mínimo de 10 dias após o tratamento com o produto. Continuar o tratamento por no mínimo 48 h após o desaparecimento do quadro clínico. Não administrar o produto em equinos, coelhos ou porcos-da- guiné, bem como nos animais com casos de hipersensibilidade conhecida aos princípios ativos da fórmula.	Ceva Saúde Animal Ltda.

1.6 Uso das tetraciclinas na bovinocultura de leite

As tetraciclinas são usadas tanto para tratar infecções locais quanto sistêmicas e são muito empregadas na bovinocultura de leite no tratamento da mastite. Também são administradas a animais como aditivos em rações como promotores de crescimento (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008), mas o uso para esse fim é proibido no Brasil (BRASIL, 2009b). Oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) e doxiciclina (DC) estão autorizadas no país para uso em bovinos. Para a OTC há quarenta e quatro produtos registrados na forma base ou cloridrato para a espécie bovina, enquanto que para a TC, CTC e DC apenas sete, um e três, respectivamente. Os períodos de carência variam muito entre os produtos contendo o mesmo princípio ativo, dependendo da formulação, dosagem e via de administração. Para a OTC, por exemplo, alguns produtos não são indicados para o uso em vacas leiteiras lactantes, enquanto outros informam um período de carência de três a sete dias após a última aplicação para que o leite possa ser industrializado ou consumido pelo homem. Ainda para a OTC, o período de carência recomendado para o abate é de cinco a trinta dias (COMPÊNDIO de Produtos Veterinários, 2010).

Embora não se tenha tido acesso a dados oficiais, pelo número de produtos registrados supõe-se que a OTC é a tetraciclina mais empregada no Brasil para o tratamento da mastite. Apesar da produção nacional de leite estar crescendo ao longo do anos, a produtividade ainda é considerada baixa. Esse baixo desempenho da atividade leiteira, presente em 25,8% do total de estabelecimentos agropecuários brasileiros em 2006 deve-se a sistemas de produção extensivos ou semi-extensivos. Apesar de estar ocorrendo uma especialização da atividade, esses sistemas apresentam diferentes níveis tecnológicos e ainda são muitas vezes inadequados e responsáveis por uma maior disseminação de doenças como a mastite, atacadas com o uso nem sempre consciente de antibióticos (EMBRAPA, 2008b). Assim, resíduos em níveis superiores aos permitidos podem eventualmente estar presentes no leite, pondo em risco a segurança alimentar deste produto.

1.7 Mecanismo de ação e toxicidade dos ionóforos poliéteres

Os ionóforos poliéteres formam complexos estáveis com vários íons, principalmente sódio, potássio e cálcio e o transporte desses cátions na forma de

complexos lipofílicos através da membrana celular provoca o desequilíbrio osmótico das eimérias (LINDSEY; BLAGBURN, 1995).

A elevada toxicidade dos ionóforos poliéteres é bem relatada na literatura. Essas substâncias apresentam atividade inotrópica, ou seja, influenciam a contratilidade do tecido muscular, produzindo efeitos farmacológicos agudos sobre o sistema cardiovascular, com aumento do fluxo coronariano e dilatação coronariana. Em indivíduos normais, é pouco provável que a dilatação coronariana possa provocar qualquer efeito adverso. Entretanto, vítimas de doença coronariana arterial podem ser mais susceptíveis, já que em áreas isquêmicas do tecido cardíaco, o fluxo sanguíneo já é maximizado na tentativa de manter uma irrigação adequada dessas áreas. Uma dilatação de artérias coronarianas normais, induzida por um ionóforo, tenderia a provocar uma redução posterior na perfusão do miocárdio parcialmente obstruído, um efeito conhecido como “furto coronariano”. Quaisquer tipos de reações adversas à monensina seriam inevitavelmente encobertas pela ocorrência espontânea de hipóxia em vítimas de doença coronariana arterial. Todavia, a possibilidade de que a presença de resíduos de monensina ou outros ionóforos em alimentos possam exacerbar a condição de indivíduos afetados permanece, não eliminando assim o risco potencial à saúde humana (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998).

A maior parte dos efeitos cardiovasculares observados em estudos com animais foram caracterizados utilizando-se a monensina como representante de toda a família. Experimentos têm mostrado que a lasalocida tem um efeito tóxico ao coração semelhante à monensina e que em algumas espécies animais ela também apresenta uma ação neurotóxica potente. Apesar da síndrome da morte súbita ainda não ser bem entendida, acredita-se que as principais causas sejam a cardiomiopatia, em particular a cardiomiopatia hipertrófica e a miocardite. Há evidências relacionando essas condições ao consumo de ionóforos. As dosagens empregadas nos estudos em animais onde os efeitos tóxicos dos ionóforos foram observados são muito superiores às que provavelmente possam ser encontradas nos alimentos. Entretanto, a possibilidade de reações adversas pelo consumo de produtos contaminados não pode ser descartada (YOUNG; NUNAN, 2004).

Três produtos à base de salinomicina foram avaliados em 2004 pela Autoridade de Segurança Alimentar Européia (EFSA). Para um deles (Kokcisan[®] 120G), um dos testes de mutagenicidade teve resultado positivo, enquanto que para

o segundo produto (Bio-cox[®] 120G) não se afastou a possibilidade de genotoxicidade (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004a, 2004d).

Como bem apresentado no artigo de revisão de Nogueira, França e Peixoto (2009), devido à pequena margem de segurança entre a dose eficaz e a tóxica, há diversos casos de envenenamento em aves, bovinos, ovinos, suínos, cães e equinos, que apresentam entre todas as espécies a maior susceptibilidade. A intoxicação de fazendeiros que manipularam as rações medicadas é também descrita na literatura. Em sete casos de envenenamento em humanos por maduramicina o quadro clínico apresentado foi de polineuropatia com rabdomiólise e insuficiência renal aguda (SHARMA et al., 2005). Há relato de caso de intoxicação humana por monensina sódica no Brasil, que acarretou a morte de um jovem de 17 anos devido ao quadro clínico de mioglobinúria (necrose muscular aguda com liberação de mioglobina na circulação e na urina), seguida de insuficiência renal, onze dias após a ingestão do antibiótico (KOUYOUMDJIAN et al., 2001).

Pesquisas recentes indicam que a resistência a essas drogas está disseminada, mas elas ainda são a classe mais importante de anticoccidianos (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008).

1.8 Mecanismo de ação e toxicidade dos macrolídeos

Os macrolídeos se ligam reversivelmente à subunidade 50S dos ribossomos das bactérias, interferindo na síntese de proteína. De forma geral, com exceção da tilmicosina, não atuam contra bactérias gram-negativas e são bacteriostáticos, mas eritromicina em elevadas concentrações é bactericida. São também ativos contra micoplasmas e algumas rickétsias.

Distúrbios gastro-intestinais, reações de hipersensibilidade e inibição do metabolismo hepático são alguns dos efeitos colaterais relatados, mas não há evidências de efeitos tóxicos mais graves, exceto pela tilmicosina, que pode causar taquicardia e diminuição da contratilidade, não devendo ser administrada em suínos. Distúrbios gastro-intestinais em equinos podem levar os animais à morte.

A principal preocupação em relação ao uso desses antibióticos é a resistência bacteriana, que pode se desenvolver rapidamente (eritromicina) ou lentamente (tilosina) (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008). Em 2007 um encontro de especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) priorizou os macrolídeos como uma das três classes de antimicrobianos para o desenvolvimento

de estratégias de gestão de risco a fim de preservar sua eficácia na medicina humana, já que a resistência pode emergir em patógenos zoonóticos como *Campylobacter spp* e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). A Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) também identificou esta classe como antimicrobianos importantes na medicina veterinária (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2007). Embora estudos confiáveis em humanos ainda não estejam disponíveis para a claritromicina, experimentos com doses elevadas do antibiótico em animais resultaram em toxicidade fetal, incluindo anomalias cardiovasculares, retardo do crescimento e incidência elevada de perda fetal e fenda palatina (THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2005).

1.9 Mecanismo de ação e toxicidade das lincosamidas

Da mesma forma que os macrolídeos, as lincosamidas inibem a síntese de proteína bacteriana em nível ribossômico pela ligação à subunidade 50S, afetando a iniciação do processo da cadeia peptídica. Podem ser bacteriostáticas ou bactericidas, dependendo da concentração e atuam sobre microorganismos gram-positivos, particularmente estreptococos e estafilococos.

A resistência bacteriana pode se desenvolver lentamente e é a principal preocupação, já que efeitos adversos mais graves não foram relatados. Os mais comuns são reações de hipersensibilidade e distúrbios gastrointestinais. Equinos são especialmente sensíveis, podendo desenvolver colite grave e fatal. Em altas concentrações foi observada paralisia do músculo esquelético (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008).

1.10 Mecanismo de ação e toxicidade das tetraciclinas

O mecanismo de ação das tetraciclinas baseia-se na inibição da síntese proteica através de ligações reversíveis à subunidade ribossômica 30S das bactérias. A resistência microbiana baseia-se quase exclusivamente na penetração reduzida da droga em organismos previamente sensibilizados e está disseminada devido ao grande uso de tetraciclinas em níveis reduzidos (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008).

Além de facilitar a infecção de patógenos não susceptíveis (bactérias resistentes, fungos e leveduras), efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos foram verificados em humanos e outros animais. Dermatite fototóxica foi relatada após tratamento com dimetilclortetraciclina e reações de hipersensibilidade também são um dos efeitos adversos conhecidos. As tetraciclina podem ser depositadas na fase de mineralização óssea e dentária, através dos íons de cálcio. Isto leva a danos nos dentes e diminui o crescimento ósseo. Estudos em animais mostraram indicações de efeitos embriotóxicos/teratogênicos (THE MERCK VETERINARY MANUAL, 2008).

1.11 Natureza dos ionóforos poliéteres

Diferentes homólogos (A, B, C,...) são obtidos no processo de fermentação por *Streptomyces*, sendo os homólogos A os mais abundantes. Os ionóforos poliéteres apresentam em sua estrutura múltiplos éteres cíclicos, um grupo ácido carboxílico terminal e um grupo álcool na outra extremidade da cadeia (Figura 1). Os átomos de oxigênio das funções éter servem como ligantes para a complexação de íons metálicos, possibilitando a rápida formação de complexos pseudo-macrocíclicos estáveis, eletronicamente neutros, com cátions monovalentes e divalentes (Figura 2) (ELLIOTT; KENNEDY; MCCAUGHEY, 1998). O envolvimento do grupo carboxílico ionizado não é sempre essencial para a ligação metálica. Enquanto que para a lasalocida a carboxila ionizada é indispensável para a ligação metálica, o mesmo não é observado para a complexação de íons sódio pela monensina. Todos os ionóforos complexam cátions monovalentes, exceto a lasalocida, que além de atuar nos íons monovalentes pode formar complexos com cátions divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} . Assim, segundo seu modo de ação e estrutura química podem ser subdivididos em três grupos: ionóforos monovalentes (monensina, salinomicina e narasina), ionóforos glicosídeos monovalentes (maduramicina e senduramicina) e ionóforos divalentes (lasalocida).

A Tabela 4 apresenta os ionóforos poliéteres, os acrônimos empregados nesse texto para a designação das substâncias, suas fórmulas moleculares, massas moleculares e números de registro no “The Chemical Abstracts” (número CAS).

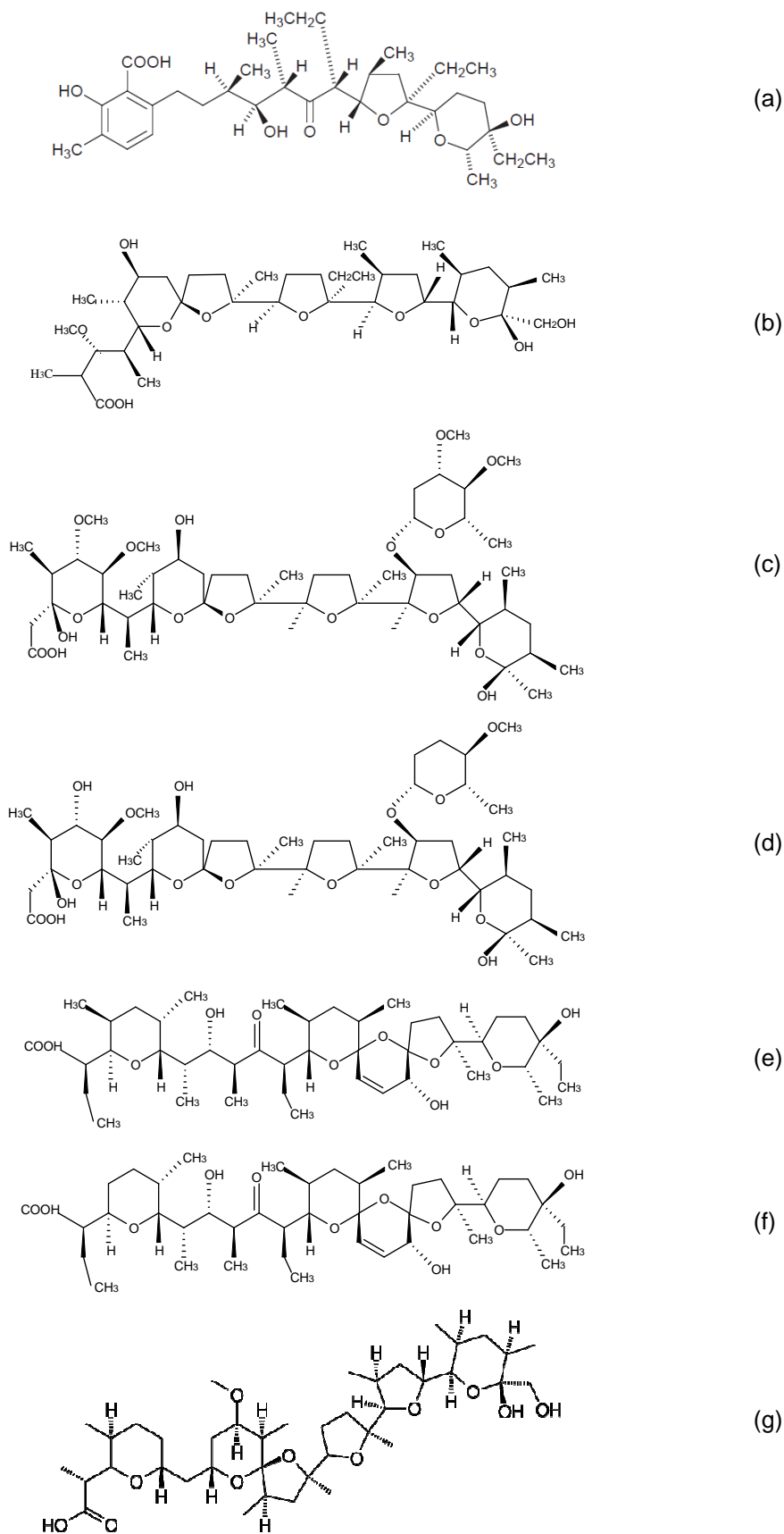


Figura 1. Estrutura dos antibióticos ionóforos poliéteres: (a) lasalocida, (b) monensina, (c) maduramicina, (d) senduramicina, (e) narasina, (f) salinomycin, (g) nigericina.

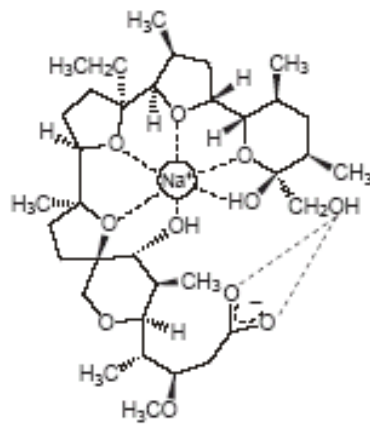


Figura 2. Complexação de íons sódio pela monensina.

Tabela 4. Identificação dos ionóforos poliéteres.

Substância	Acrônimo	CAS No.	Fórmula molecular	Massa molecular, M (g/mol)	Massa molecular exata, M _r (Da)
Lasalocida A sal sódico	LAS-Na	25999-20-6	C ₃₄ H ₅₃ O ₈ Na	612,77	612,36
Lasalocida A ácido livre	LAS	25999-31-9	C ₃₄ H ₅₄ O ₈	590,79	590,38
Maduramicina (α) sal de amônio	MAD-NH ₄	84878-61-5	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₇ N	934,16	933,56
Maduramicina (α) ácido livre	MAD	79935-08-4	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	917,13	916,54
Monensina A sal sódico	MON-Na	17090-79-8	C ₃₆ H ₆₁ O ₁₁ Na	692,85	692,41
Monensina A ácido livre	MON	22373-78-0	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	670,87	670,43
Narasina A ácido livre	NAR	55134-13-9	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₁	765,02	764,51
Nigericina sal sódico	NIG-Na	28643-80-3	C ₄₀ H ₆₇ O ₁₁ Na	746,94	746,46
Nigericina ácido livre	NIG	28380-24-7	C ₄₀ H ₆₈ O ₁₁	724,96	724,47
Salinomicina sal sódico	SAL-Na	55721-31-8	C ₄₂ H ₆₉ O ₁₁ Na	772,98	772,47
Salinomicina ácido livre	SAL	53003-10-4	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₁	751,00	750,49
Senduramicina sal sódico	SEN-Na	119068-77-8	C ₄₅ H ₇₅ O ₁₆ Na	895,05	894,49
Senduramicina ácido livre	SEN	113378-31-7	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₆	873,07	872,51

1.12 Natureza dos macrolídeos e lincosamidas

Os macrolídeos comumente usados possuem um anel lactona macrocíclico de 14 a 16 átomos, ao qual estão ligados um ou mais neutro e/ou amino deoxiaçúcares (geralmente cladinose e desosamina). Eritromicina e claritromicina pertencem aos macrolídeos de anéis lactona formados por 14 átomos, enquanto tilosina àqueles formados por 16 átomos (Figura 3). Na realidade, eles são uma mistura complexa de antibióticos estreitamente relacionados.

A lincomicina, o mais importante antibiótico do grupo das lincosamidas, é um derivado monobásico de um aminoácido, o ácido L-hígrico, ligado por um grupo amida a um monossacarídeo de estereoquímica galactose, o D-galactopiranosose (RAJESWARAN; SRIKRISHNAN, 2004). A Figura 4 apresenta a estrutura da lincomicina.

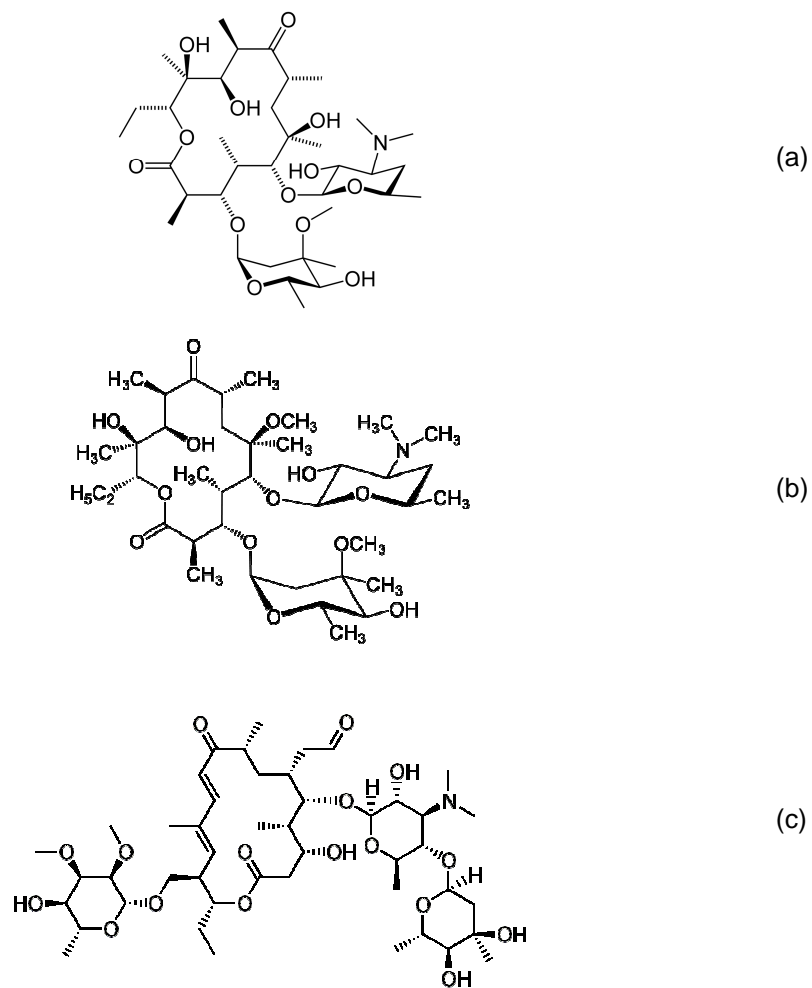


Figura 3. Estrutura dos antibióticos macrolídeos estudados: (a) eritromicina, (b) claritromicina, (c) tilosina.

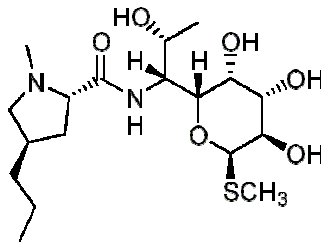


Figura 4. Estrutura da lincosamida estudada: lincomicina.

A Tabela 5 apresenta os acrônimos, números de registro CAS, fórmulas moleculares e massas moleculares da lincosamida e dos macrolídeos avaliados.

Tabela 5. Identificação da lincosamida e dos macrolídeos usados nesta tese.

Substância	Acrônimo	CAS No.	Fórmula molecular	Massa molecular, M (g/mol)	Massa molecular exata, M _r (Da)
Lincomicina	LIN	154-21-2	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	406,54	406,21
Eritromicina	ERI	114-07-8	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,93	733,46
Claritromicina	CLA	81103-11-9	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	747,95	747,48
Tilosina	TIL	1401-69-0	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916,10	915,52

1.13 Natureza das tetraciclina

A Tabela 6 apresenta os acrônimos empregados nesse texto para a designação das tetraciclina estudadas, suas fórmulas moleculares e massas moleculares e a Figura 5 suas fórmulas estruturais.

Tabela 6. Identificação das tetraciclina.

Substância	Acrônimo	CAS No.	Fórmula molecular	Massa molecular, M (g/mol)	Massa molecular exata, M _r (Da)
Oxitetraciclina	OTC	79-57-2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460,43	460,15
4-Epi-oxitetraciclina	4-EOTC	35259-39-3	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460,43	460,15
Tetraciclina	TC	60-54-8	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,43	444,15
4-Epi-tetraciclina	4-ETC	23313-80-6	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,43	444,15
Clortetraciclina	CTC	57-62-5	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	478,88	478,11
4-Epi-clortetraciclina	4-ECTC	101342-45-4	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	478,88	478,11
Doxiciclina	DC	564-25-0	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,43	444,15
Demeclociclina	DMC	127-33-3	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₂ O ₈	464,85	464,10
Metaciclina	MTC	3963-95-9	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈	442,42	442,14

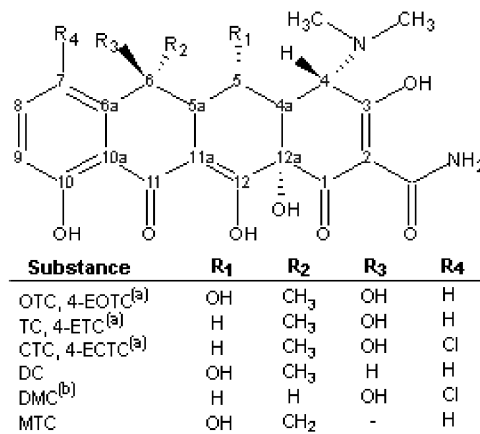


Figura 5. Estrutura das tetraciclina. ^(a) Os 4-epímeros da OTC, TC e CTC diferem das substâncias originais porque o hidrogênio no carbono 4 está na direção oposta ao grupo dimetilamino. ^(b) DMC é geralmente empregada como padrão interno.

1.14 O processo de Avaliação de Risco de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos

A Análise de Risco tem sido adotada como a base metodológica para o desenvolvimento de normas de inocuidade alimentar. Segundo o *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2010, p. 91, tradução nossa), a Avaliação do Risco (*Risk Assessment*) é o “processo baseado em conhecimentos científicos, constituído das seguintes etapas: (i) identificação do perigo, (ii) caracterização do perigo; (iii) avaliação da exposição e (iv) caracterização do risco”.

O estabelecimento do valor da Ingestão Diária Aceitável (IDA) normalmente é o resultado das duas primeiras etapas. Para os casos onde não se possa estabelecer doses limiares, os dados de exposição são comparados à atividade da substância, ao invés da IDA. Na etapa de avaliação da exposição são necessários dados sobre os níveis de resíduos nos alimentos, enquanto que na etapa de caracterização do risco, são integrados os resultados das etapas anteriores para fins de estabelecimento dos Limites Máximos de Resíduos (LMR). Diversos fatores são considerados, como a disponibilidade de metodologias analíticas, as Boas Práticas no Uso de Medicamentos Veterinários e a ingestão estimada dos alimentos, além de

dados de degradação do resíduo total. Contudo, a IDA é o principal parâmetro considerado. Caso o uso adequado do medicamento veterinário forneça uma ingestão de resíduos menor que a IDA, o LMR recomendado pode ser reduzido considerando-se os outros fatores. Entretanto, se os resíduos não podem ser determinados pelas metodologias analíticas disponíveis, o LMR recomendado pode ser ajustado de forma que possibilite sua verificação. Caso a exposição humana exceda a IDA, o risco é considerado significativo e um LMR não pode ser recomendado sob as condições avaliadas. Alterações na formulação do produto, extensão do período de retirada do medicamento e a adoção de um método analítico mais adequado são algumas das medidas que podem ser requeridas. Esse é o procedimento adotado pelo Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares, o JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), que efetua a Avaliação de Risco de resíduos de medicamentos veterinários, contaminantes, toxinas naturais e aditivos alimentares e recomenda valores de LMRs ao Comitê do Codex sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (*Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods - CCRVDF*) para adoção pela Comissão do *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2000).

A mesma posição é seguida pelo Comitê para Produtos Medicinais Veterinários (*Committee for Veterinary Medicinal Products, CVMP*) e pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority, EFSA*), que efetuam avaliações de risco para a União Europeia relativas a medicamentos e aditivos usados na alimentação animal, respectivamente. O CVMP é o órgão da Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency, antiga EMEA, atual EMA*), responsável pela autorização de comercialização e estabelecimento de LMRs de medicamentos veterinários na União Europeia. A EFSA, criada em 2002, substituiu o Comitê Científico para a Alimentação Animal (*Scientific Committee for Animal Nutrition, SCAN*). Outras organizações governamentais regulatórias em diversas partes do mundo também observam esta prática.

Os dados de consumo de alimentos usados pelo JECFA na avaliação da exposição baseiam-se em uma cesta teórica de alimentos que foi calculada há décadas, considerando informações sobre os hábitos de consumo de um número muito restrito de países (FAO/WHO, 2006b). Esse modelo considera atualmente a ingestão diária de 500 g de carne de mamíferos ou de aves domésticas (300 g de músculo, 100 g de fígado, 50 g de rins, 50 g de gordura), 1,5 kg de leite, 100 g de ovos e 20 g de mel. Para peixes, a ingestão diária é de 300 g, incluindo músculo e

pele em proporções naturais. Para suínos e aves domésticas, a quantidade de gordura pode ser substituída pela mesma quantidade de pele e gordura em proporções naturais.

Até 2005 o JECFA considerava para o cálculo da ingestão crônica a Ingestão Diária Teórica Máxima (IDTM), somatório da multiplicação dos valores de ingestão diária de cada alimento com base na cesta teórica pelos seus respectivos LMRs. Embora o uso da cesta teórica de alimentos produzisse estimativas conservadoras da exposição crônica, ele não refletia a situação real. Por isso, uma nova abordagem, baseada na comparação da IDA com a Ingestão Diária Estimada (IDE), derivada da mediana dos valores de concentração de resíduos nos tecidos (e não com a IDTM) foi proposta e adotada a partir da 66ª reunião do JECFA, em fevereiro de 2006 (FAO/WHO, 2006a). As Figuras 6 e 7 apresentam as diferenças entre os modelos.

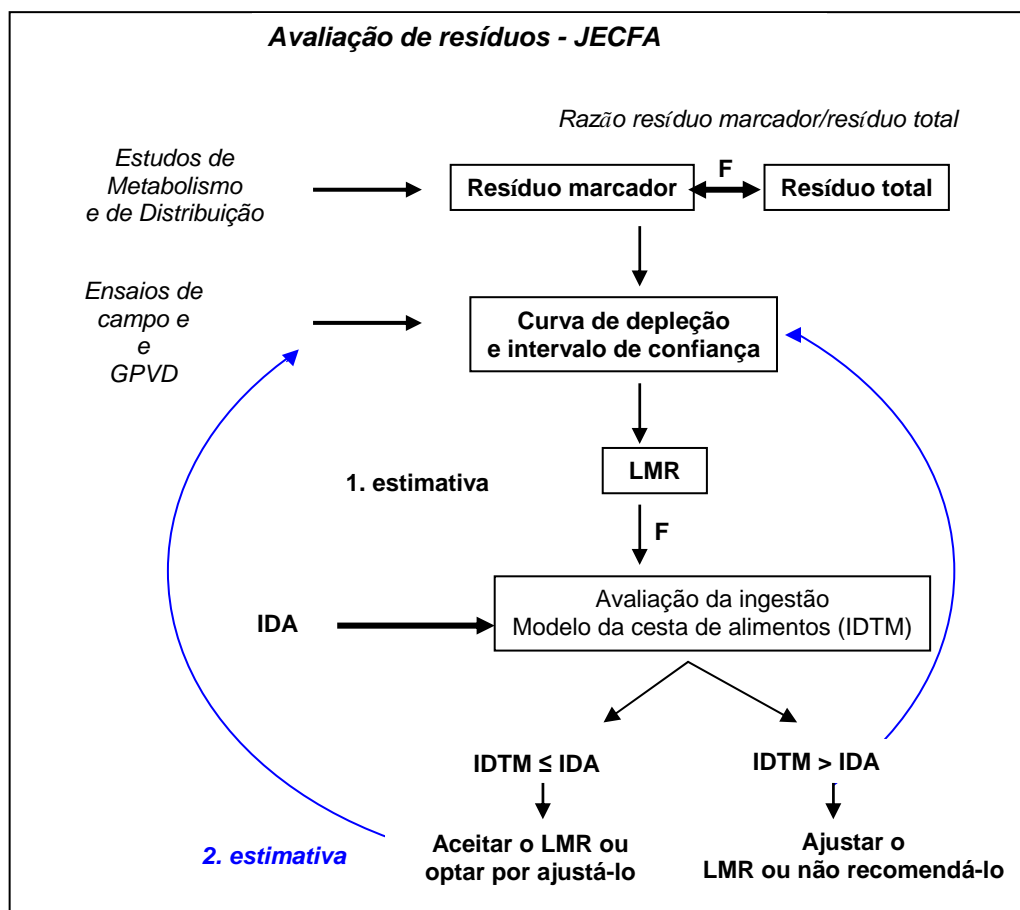


Figura 6. Modelo antigo de avaliação dos dados de resíduos e recomendação de LMRs pelo JECFA. F = razão do resíduo marcador em relação ao resíduo total. Adaptado de FAO/WHO (2006b).

A única diferença entre os dois procedimentos é que a concentração mediana substituiu o LMR na fórmula de cálculo como estimativa provável da concentração do resíduo. Os valores de LMR e da mediana são derivados do mesmo *time point* dos dados de depleção do resíduo marcador. O LMR é um ponto da curva que descreve o limite de confiança superior unicaudal a 95% sobre o 95º percentil. A mediana é o ponto correspondente na linha de regressão para o mesmo *time point*. Ambos os valores são obtidos de uma avaliação estatística de dados provenientes de estudos em animais para os quais os medicamentos são indicados, na maior dosagem aprovada, seguindo as Boas Práticas no Uso de Medicamentos Veterinários, a fim de estabelecer os LMRs através da análise dos tecidos comestíveis (músculo, fígado, rins e gordura), bem como leite e ovos (Figura 8).

A existência de resíduos ligados é considerada na estimativa da ingestão diária máxima de resíduos que possuem essa propriedade, avaliando-se a potência toxicológica e a biodisponibilidade.

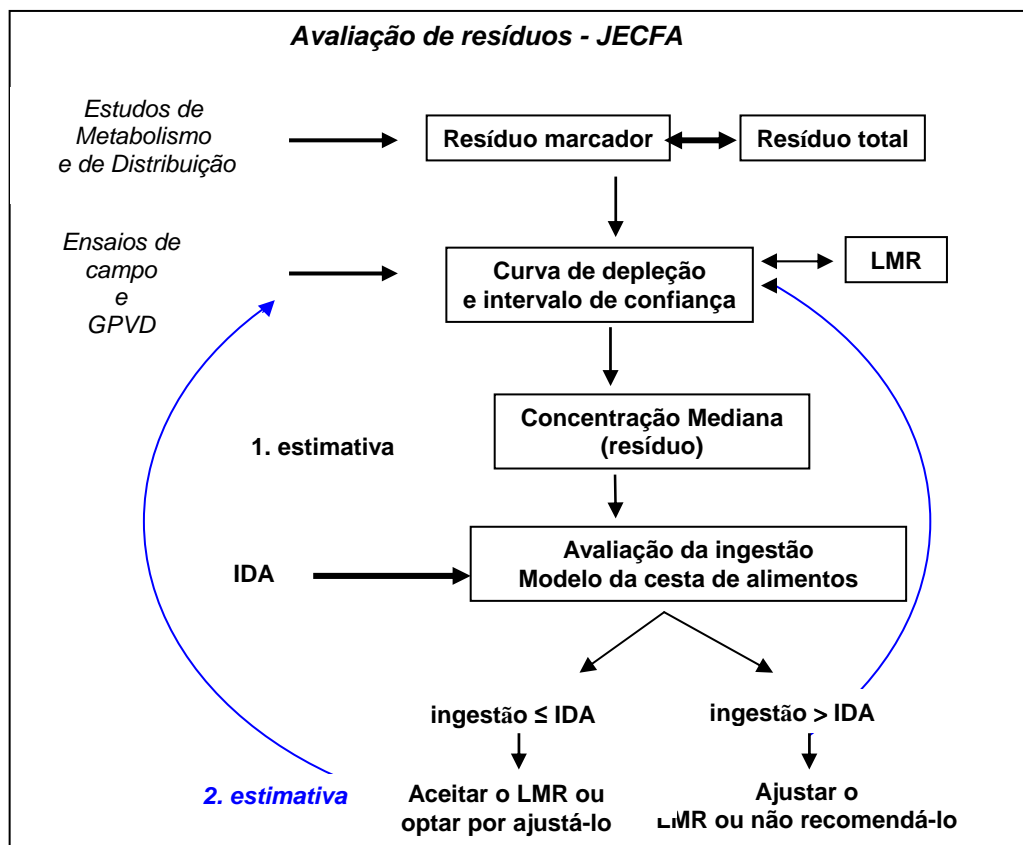


Figura 7. Modelo atual de avaliação dos dados de resíduos e recomendação de LMRs pelo JECFA, já considerando a Ingestão Diária Estimada (IDE), derivada da mediana dos valores de concentração nos tecidos. Adaptado de FAO/WHO (2006a).

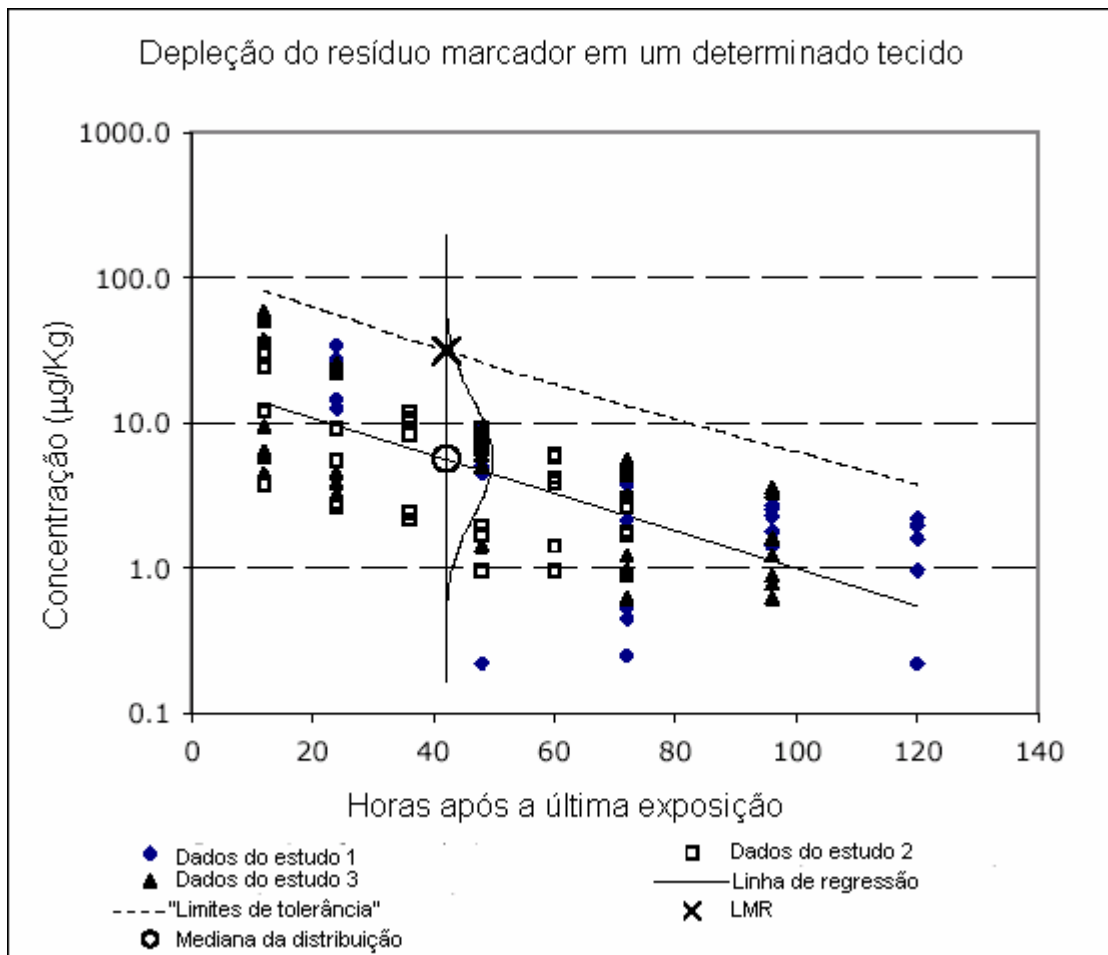


Figura 8. Relação entre o LMR e a concentração mediana usada para o cálculo da Ingestão Diária Estimada. Adaptado de FAO/WHO (2006a).

A abordagem empregada pelo CVMP para a Avaliação de Risco de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos na Europa é bastante semelhante à do JECFA. Apesar dos dados de ingestão diária de alimentos serem baseados no padrão de consumo europeu, as estimativas de ingestão são as mesmas usadas pelo JECFA, porém há diferenciação do tipo de gordura e de rins para mamíferos e aves domésticas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2001). Considera-se para mamíferos o consumo de 50 g de gordura e 50 g de rins e para aves domésticas de 90 g de gordura e 10 g de rins. A avaliação da exposição também considera a concentração dos resíduos em produtos de origem animal provenientes do padrão de depleção da substância observado em estudos com animais aos quais se destinam o medicamento. Entretanto, os LMR são calculados com base na ingestão diária teórica máxima (IDTM), que não pode exceder a IDA, ou seja, de acordo com a abordagem antiga empregada pelo JECFA.

1.15 Avaliação e gestão de riscos referentes aos ionóforos poliéteres em aves

Diferentes autoridades regulatórias têm adotado LMRs ou tolerâncias para os ionóforos poliéteres, com base em valores de IDAs calculados nos diversos ensaios toxicológicos, microbiológicos e farmacológicos (Tabela 7).

Dois ionóforos poliéteres, a monensina e a narasina, foram avaliados recentemente pelo JECFA. Valores de 0-10 e de 0-5 µg/kg de peso corpóreo foram recomendados como IDA para a monensina e a narasina, respectivamente. Um LMR de 10 µg/kg foi estabelecido para a monensina em músculo, fígado e rins de frangos, perus e codornas, enquanto um LMR dez vezes maior foi estabelecido para gordura dessas espécies, além de bovinos, ovinos e caprinos. Para a narasina, um LMR de 15 µg/kg foi recomendado para músculo e rins de frangos (o mesmo LMR foi adotado para suínos) e de 50 µg/kg para fígado e gordura das mesmas espécies (ver Tabela 8). Não foram recomendados LMRs para ovos (WHO, 2009).

Alguns aditivos coccidiostáticos, anteriormente avaliados pelo Comitê Científico para a Alimentação Animal (SCAN) da União Européia (UE), foram reavaliados, a pedido da Comissão Européia, pela Autoridade de Segurança Alimentar Européia (EFSA). Em 1982 o SCAN recomendou um valor de Ingestão Diária Admissível (IDA), por quilograma de peso corpóreo ao dia, para a lasalocida igual a 5 µg (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1982a). A EFSA sugeriu em 2004 uma redução desse valor para 2,5 µg/kg (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004e), que é hoje a IDA estabelecida pela EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2007). Ainda em 2004 a EFSA recomendou os seguintes valores de Ingestão Diária Admissível (IDA), por quilograma de peso corpóreo ao dia, para os ionóforos poliéteres salinomicina (5 µg), monensina (3 µg) e narasina (5 µg) (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004b, 2004f, 2004c). As IDAs atuais para a maduramicina (1 µg/kg peso corpóreo/dia) e a senduramicina (1,25 µg/kg peso corpóreo/dia) foram estabelecidas pelo SCAN em 1988 e 2002, respectivamente (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1988, 2002).

Na Austrália a IDA, por quilograma de peso corpóreo ao dia, foi estabelecida em 1 µg para a lasalocida e maduramicina, 10 µg para a monensina, narasina e salinomicina e 3 µg para a senduramicina (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008).

Tabela 7. Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para ionóforos poliéteres adotados por diferentes autoridades regulatórias.

Substância (resíduo marcador)	Fonte/Referência	IDA toxicológica (µg/kg peso corpóreo/dia)
Lasalocida ^a	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1982a)	5
	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2007)	2,5
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	1
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	10
Maduramicina de amônio ^b	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1988)	1
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	1
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-
Monensina	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1981, 1983)	-
	UE (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004f, 2005, 2006a)	3
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	10
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	12,5
	Codex Alimentarius (WHO, 2009)	10
Narasina	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1982b, 1984a)	-
	UE (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004c)	5
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	10
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	5
	Codex Alimentarius (WHO, 2009)	5
Salinomicina ^c	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1982c, 1984b)	50
	UE (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004b)	5
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	10
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	5
Senduramicina ^b	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 2002)	1,25
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	3
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	180

^a Para um produto à base de lasalocida avaliado pela EFSA não foi possível estabelecer uma IDA, pois não se confirmou completamente a similaridade entre os perfis metabólicos da lasalocida sódica em animais de laboratório e frangos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004e, 2004g). ^b Não reavaliado pela EFSA. ^c Para dois produtos à base de salinomicina avaliados pela EFSA não foi possível estabelecer uma IDA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004a, 2004d, 2006b).

Já as IDAs (em µg/kg peso corpóreo/dia) estabelecidas pela agência americana *Food and Drug Administration (FDA)* são bem maiores para a lasalocida e senduramicina: 10 µg/kg para a lasalocida, 12,5 µg/kg para a monensina, 5 µg/kg para a narasina e salinomicina e 180 µg/kg para a senduramicina (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).

A Tabela 8 apresenta os valores de LMRs adotados pelas diferentes autoridades regulatórias. Dos resultados dos estudos de depleção dos resíduos em tecidos comestíveis, os resíduos marcadores foram definidos como os compostos originais. Os tecidos alvos foram na sua maioria pele/gordura.

As tolerâncias adotadas pelos EUA e Austrália são superiores às da UE, que só estabeleceu LMRs até o momento para a lasalocida em aves de capoeira (músculo, fígado, rins, pele com gordura e ovos) e para a monensina em músculo, fígado, rins, gordura e leite de bovinos (EUROPEAN COMMISSION, 2009b, 2010). Considerando que não foram estabelecidos LMRs para os demais ionóforos, e que a contaminação de ração não medicada com ração medicada era inevitável, foram estabelecidos Limites Máximos (LM), ou tolerâncias, cujos valores são de 2 µg/kg para maduramicina, monensina, narasina e senduramicina e 3 µg/kg para a salinomicina (EUROPEAN COMMISSION, 2009a).

O uso dos coccidiostáticos e histomonostáticos como aditivos destinados à alimentação animal deverá ser banido até 31 de dezembro de 2012 da União Européia (EUROPEAN COMMISSION, 2003).

Os ionóforos foram incluídos no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR do MAPA em 2007 (BRASIL, 2008a). Entretanto, até hoje esses princípios ativos estão sendo monitorados somente em fígado de bovinos e músculo de aves. Senduramicina não está incluída nos ionóforos avaliados (BRASIL, 2010). O Programa de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos – PAMVet, proposto pela ANVISA contempla a avaliação de carne de frango e ovos para a determinação de resíduos, embora a seleção dos princípios ativos a serem monitorados nesses alimentos ainda não tenha sido efetuada (BRASIL, 2003).

No Brasil são adotados preferencialmente os LMRs harmonizados no Mercosul, que são os mesmos recomendados pelo CCRVDF (Codex Alimentarius), os adotados na União Européia e nos EUA, na escala de priorização.

Tabela 8. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Lasalocida sódica	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2007)	lasalocida A	aves domésticas	20	100	50	100	150
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010)	lasalocida	aves domésticas	100	400	400	1000	50 ^a
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	lasalocida	frangos	-	400 ^c	-	1200 ^c	-
			perus	-	400 ^c	-	400 ^c	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009)	lasalocida	frangos	-	-	-	350	-
Maduramicina de amônio	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2009a)	-	-	-	-	-	-	2 ^c
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010)	maduramicina	aves domésticas	100	1000	1000	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	maduramicina de amônio	frangos	240 ^b	720 ^b	-	380 ^c	-
							(gordura) 480 ^b	
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009)	maduramicina	frangos	-	-	-	400	-

Continuação da Tabela 8. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Monensina sódica	UE (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004f, 2006a)	monensina	frangos e perus	50 ^d	50 ^d	50 ^d	50 ^d	-
	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2009a)	monensina	outras que não frangos de engorda e perus	-	-	-	-	2 ^c
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010)	monensina	aves domésticas	500 ^{a, e}	500 ^a	500 ^a	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	monensina	frangos, perus e faisão	Não necessário	Não necessário	Não necessário	Não necessário	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009)	monensina	frangos e perus	50 ^f	50 ^f	50 ^f	50 ^f	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2009)	monensina	frangos, perus e codorna	10	10	10	100 (gordura)	-

Continuação da Tabela 8. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Narasina	UE (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004c)	narasina	frangos	50 ^d	50 ^d	50 ^d	50 ^d	50 ^d
	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2009a)	narasina	outras que não frangos de engorda	-	-	-	-	2 ^c
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010)	narasina	aves domésticas	100	100	100	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	narasina	frangos	-	-	-	480 ^{c, g}	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009)	narasina	frangos	50	-	-	500 ^g	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2009)	narasina A	frangos	15	50	15	50 (gordura)	-
Salinomicina sódica	UE (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004b)	salinomicina	frangos	5 ^d	5 ^d	5 ^d	5 ^d	5 ^d
	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2009a)	salinomicina	outras que não frango de engorda	-	-	-	-	3 ^c
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010)	salinomicina	aves domésticas	100	500	500	-	20 ^a
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-	-	-	-	-	-	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009)	salinomicina	frangos	-	-	-	350	-

Continuação da Tabela 8. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Senduramicina sódica	UE (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 2002)	senduramicina	frangos	-	-	-	-	-
	UE (EUROPEAN COMMISSION, 2009a)	senduramicina	outras que não frango de engorda	-	-	-	-	2 ^c
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010)	senduramicina	frangos	50 ^a	500	200	500	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	senduramicina	frangos de corte	130 ^c	400 ^c	-	-	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009)	-	-	-	-	-	-	-

^a O LMR foi estabelecido no limite de quantificação do método analítico ou próximo. ^b Concentração segura e não tolerância, isto é, a concentração total do resíduo considerada segura em tecidos cosméticos. ^c Tolerância, isto é, a concentração do resíduo marcador no tecido alvo usado para monitorar os resíduos totais da droga nos animais alvo. ^d Proposta de LMR provisório para todos os tecidos. ^e O LMR foi expresso sobre base gordura, ao invés do produto como um todo. Só a gordura aderida é analisada. ^f Tecidos comestíveis. LMR "administrativo" para qual o processo de promulgação foi iniciado. ^g LMR expresso somente sobre gordura abdominal.

1.16 Avaliação e gestão de risco referentes aos macrolídeos e lincosamidas em aves

A Tabela 9 apresenta os valores de IDAs e a Tabela 10 os valores de LMRs estabelecidos em diferentes países para macrolídeos e lincosamidas.

Até o momento os macrolídeos e lincosamidas não estão sendo avaliados em ovos, sendo que os princípios ativos eritromicina, tilosina, tilmicosina, clindamicina e lincomicina estão sendo pesquisados pelo MAPA em rins de bovinos, suínos, aves e equinos (BRASIL, 2010).

Tabela 9. Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para lincosamidas e macrolídeos estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância (resíduo marcador)	Classe do antibiótico	Fonte/Referência	IDA toxicológica (µg/kg peso corpóreo/dia)
Lincomicina	lincosamida	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1998a)	300 ^a
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	1000
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	25
		<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2002)	30
Pirlimicina	lincosamida	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1998b)	100 ^b
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	-
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	10
		<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2004)	8
Espiramicina	macrolídeo	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, [entre 1995 e 1999])	50 ^c
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	750
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-
		<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 1998)	50
Kitasamicina	macrolídeo	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	500
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-

Continuação da Tabela 9. Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para lincosamidas e macrolídeos estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias

Substância (resíduo marcador)	Classe do antibiótico	Fonte/Referência	IDA toxicológica ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo/dia)
Tilmicosina	macrolídeo	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1997a)	4 ^c
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	2
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	25
		<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2009)	40
Tilosina	macrolídeo	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1997b)	500 ^d
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	300
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-
		<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2009)	30
Eritromicina	macrolídeo	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2002a)	300 ^c
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	-
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-
		<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2006)	0,7
Tulatromicina	macrolídeo	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2002b)	50 ^e
		Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	-
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	15
Oleandomicina	macrolídeo	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	-
		EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-

^a Uma IDA microbiológica de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi estabelecida. ^b Uma IDA microbiológica de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi estabelecida. ^c IDA microbiológica. ^d Uma IDA microbiológica de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi estabelecida. ^e Uma IDA microbiológica de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi estabelecida.

Tabela 10. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Lincomicina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1998a)	lincomicina	frangos	100	500	1500	50	50
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	lincomicina	aves domésticas	100	100	100	-	200
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	lincomicina	frangos	Não necessário	Não necessário	Não necessário	Não necessário	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	lincomicina	frangos	100	500	-	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2002)	lincomicina	frangos	200	500	500	300 100 (gordura)	-
Espiramicina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, [entre 1995 e 1999])	-	-	200	400	-	300	-
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	espiramicina	aves domésticas	100 ^a	1000 ^a	1000 ^a	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	-	-	-	-	-	-	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 1998)	Espiramicina + neoespira	frangos	200	600	300	300 (gordura)	-
Kítasamicina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY)	-	-	-	-	-	-	-
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	kítasamicina	aves domésticas	200 ^a	200 ^a	200 ^a	-	200 ^a
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	-	-	-	-	-	-	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	-	-	-	-	-	-	-

Continuação da Tabela 10. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Tilmicosina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1997a)	tilmicosina	frangos	75	1000	250	75	-
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	-	-	-	-	-	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	-	-	-	-	-	-	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2009)	tilmicosina	frangos	150	2400	600	250	-
			perus	100	1400	1200	250	-
Tilosina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1997b)	tilosina	aves domésticas	100	100	100	-	200
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	tilosina A	aves domésticas	200 ^a	200 ^a	200 ^a	100 ^a	200 ^a
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	tilosina	frangos e perus	200	200	200	200 (gordura)	200
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	tilosina	frangos e perus	200	200	200	200 (gordura)	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2009)	tilosina A	frangos	100	100	100	100	300
Eritromicina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2002a)	eritromicina	frangos	200	200	200	200	150
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	eritromicina	aves domésticas	300 ^a	300 ^a	300 ^a	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	eritromicina	frangos e perus	125	125	125	125	25
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	eritromicina	frangos e perus	125	125	125	125	-
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 2006)	eritromicina A	frangos	100	100	100	100	50
			perus	100	100	100	100	-

Continuação da Tabela 10. Valores de Limites Máximos de Resíduos (LMRs) ou tolerâncias para aves domésticas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância	Fonte/ Referência	Resíduo marcador	Espécies animais	LMRs (µg/kg)				
				músculo	fígado	rins	gordura + pele	ovos
Oleandomicina	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	-	-	-	-	-	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	oleandomicina	frangos e perus	150	150	150	150	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	-	-	-	-	-	-	-
Carbomicina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY)	-	-	-	-	-	-	-
	Austrália (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY, 2010).	-	-	-	-	-	-	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009).	carbomicina	frangos	0	0	0	0	-
	Canadá (HEALTH CANADA, 2009).	-	-	-	-	-	-	-

^a O LMR foi estabelecido no limite de quantificação do método analítico ou próximo.

1.17 Avaliação e gestão de risco referentes às tetraciclinas em bovinos de leite

Devido a diferentes padrões de uso de medicamentos veterinários e metodologias aplicadas para avaliação de risco, diferentes valores de IDA, de LMRs (ou tolerâncias) e definições de resíduos estão disponíveis. A Tabela 11 apresenta os valores de IDAs de tetraciclinas estabelecidos por diferentes autoridades de avaliação de risco.

Tabela 11. Valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) para tetraciclinas estabelecidos por diferentes autoridades regulatórias.

Substância (resíduo marcador)	Fonte/Referência	IDA toxicológica (µg/kg peso corpóreo/dia)
Clortetraciclina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1995)	3
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	3
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	25 ^a
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 1999)	3 ^a
Doxiciclina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1996)	3
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	5
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	-
Oxitetraclina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1995)	3
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	30
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	25 ^a
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 1999)	3 ^a
Tetraciclina	UE (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1995)	3
	Austrália (OFFICE OF CHEMICAL SAFETY, 2008)	-
	EUA (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009)	25 ^a
	<i>Codex Alimentarius</i> (WHO, 1999)	3 ^a

^a IDA para resíduos totais de tetraciclinas, incluindo clortetraciclina, oxitetraclina e tetraciclina.

O Centro de Medicina Veterinária (*Center for Veterinary Medicine, CVM*) da Agência Americana para Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration, FDA*) estabeleceu para a soma de resíduos das tetraciclinas incluindo OTC, TC e CTC em leite bovino um valor de LMR de 300 µg/kg (CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 2009), enquanto na União Européia os LMRs foram estabelecidos como 100 µg/kg para OTC, TC e CTC considerando como resíduos marcadores a soma dos compostos originais e seus respectivos 4-epímeros (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1995). Na Austrália e no Canadá os valores também são de 100 µg/kg (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES

AUTHORITY, 2010; HEALTH CANADA, 2009). A doxiciclina não é permitida nesses países para uso em animais produtores de leite para consumo humano, de forma que não foram estabelecidos limites. No Brasil, os limites adotados são aqueles recomendados pelo JECFA (WHO, 1999) e aprovados pela Comissão do Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2006), 100 µg/L em leite, para a soma de OTC, TC e CTC ou cada tetraciclina individualmente.

As tetraciclina são monitoradas em leite cru pelo MAPA (BRASIL, 2010) e estão contempladas na seleção de drogas eleitas para pesquisa de resíduos pelo PAMVet (BRASIL, 2003). Entretanto, o leite pasteurizado não está selecionado como matriz para monitoramento por ambos os programas.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho consistiu na avaliação de alimentos processados (leite pasteurizado) e alimentos crus (ovos) de origem animal disponíveis no comércio quanto à presença e quantidade de resíduos de medicamentos veterinários em decorrência do emprego intencional ou acidental de produtos de uso veterinário ou de aditivos na produção. As classes de antimicrobianos e as matrizes foram selecionadas considerando-se a hipótese de exposição potencial elevada da população e a escassez de informações nacionais. Assim, pretende-se subsidiar o setor saúde com dados sobre a exposição humana a resíduos de tetraciclinas em leite pasteurizado e de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos, de forma a contribuir para ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde relacionados a esses perigos químicos.

Os objetivos específicos constituíram-se em:

1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-EM/EM para a identificação e quantificação de resíduos de tetraciclinas em leite processado.
2. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-EM/EM para a identificação e quantificação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos crus.
3. Aplicação dos métodos na análise de leite e ovos que abastecem o mercado, gerando dados sobre a possível presença de resíduos, contribuindo no sentido de aumentar as informações sobre a presença de 4-epímeros das tetraciclinas em leite e de resíduos químicos em ovos, informações ainda muito escassas na literatura mundial.
4. Avaliação, de forma inédita no país, se resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas são encontrados em ovos disponíveis comercialmente na região metropolitana do Rio de Janeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Considerando os artigos científicos contidos nos Apêndices, que contemplam seus respectivos itens de Material e Métodos, a seguir serão relatados somente os experimentos significativos, não incluídos no corpo dos artigos, que foram efetuados até a obtenção dos resultados finais. Os experimentos mais relevantes descritos nos artigos científicos de forma muito sucinta também são apresentados nessa seção.

3.1 Desenvolvimentos das metodologias analíticas

Os macrolídeos e as lincosamidas foram acrescentados à metodologia analítica quando o procedimento de extração já havia sido definido para os ionóforos poliéteres. Foi feita uma modificação das condições cromatográficas e espectrométricas (inclusão das transições específicas). Esses estudos não estão incluídos nessa seção, pois estão descritos no artigo científico constante do Apêndice C.

3.1.1 Ionóforos poliéteres

3.1.1.1 Padrões

Inicialmente o sal de amônio da maduramicina α foi adquirido da Sequoia Research Products (Cat. No. SRP00800m, Oxford, United Kingdom) e o sal de sódio da monesina A da Sigma-Aldrich (Cat. No. M5273). Posteriormente esses padrões foram adquiridos da Dr. Ehrenstorfer (Cat. No. 14670000 e Cat. No. 15291000, Augsburg, Alemanha), bem como o sal de sódio da lasalocida A (Cat. No. 14593000). Salinomicina, narasina A e o sal de sódio da nigericina foram fornecidas pela Sigma-Aldrich (Cat. No. S4526, N1271, N7143, St. Louis, MO, USA). Senduramicina sódica (Phibro Animal Health) foi gentilmente cedida pela Dra. Petra Gowik do Laboratório de Referência Europeu para Resíduos de Medicamentos Veterinários Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Berlim, Alemanha).

3.1.1.2 Solventes e Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau pró-análise (p.a) ou melhor e fornecidos pela Merck: acetato de sódio Suprapur[®] (NaOAc, Art. No. 6264), acetato de amônio p.a. (NH₄OAc Art. No. 1116), ácido fórmico Suprapur[®] (FOA, Art. No. 11670), ácido acético glacial p.a. (HOAc, Art. No. 00063) e sulfato de sódio anidro granulado para análise de traços orgânicos (Na₂SO₄ Art. No. 6639).

Metanol (MeOH) grau cromatográfico foi obtido da Baker (Art. No. 9093-68). Acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida LC/MS foi fornecida pela Merck (Art. No. 00029).

Água tipo I foi gerada pelos sistemas de purificação Milli-Q-A-10 (Millipore) ou Central CEDI 50 (Gehaka).

3.1.1.3 Materiais

Dois tipos de cartuchos foram testados nos experimentos de extração por fase sólida: Oasis[™] HLB, 60mg, 3cc, 30 µm de tamanho de partícula (Waters, Part No. WAT 094226) e Bakerbond[™] sílica, 500mg, 3mL (Baker, 7086-23).

3.1.1.4 Equipamentos

O sistema de CLAE-EM/EM empregado é composto de cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence (com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AD, degaseificador de membrana DGU-20A5, auto-amostrador SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e controladora CBM-20A) e detector API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte Turbo V[®] e sonda TurbolonSpray[®], controlado pelo software Analyst[®] versão 1.4.2. da mesma empresa.

Outros equipamentos empregados: balança analítica com resolução de 0,1mg, balança analítica semi-micro, *manifold* de extração por fase sólida, módulo triplo de aquecimento/agitação com unidade de evaporação, banho de ultrassom, potenciômetro com faixa de pH 0 a 14 (com eletrodo combinado de vidro), agitador mecânico, agitador tipo vórtex e centrífuga refrigerada.

3.1.1.5 Preparo de soluções-estoque

As massas teóricas que foram pesadas de cada padrão para o preparo das soluções-estoque na concentração nominal de 1000 µg/mL em metanol foram calculadas considerando correções de pureza, teor de água e ácido livre. Somente para a lasalocida a solução estoque foi preparada na concentração de 10 µg/mL, pois o padrão fornecido é uma solução de concentração 100 µg/mL em acetonitrila. As soluções estoque foram transferidas para microtubos e estocadas a temperaturas < -70°C em freezer de ultra-baixa temperatura.

3.1.1.6 Preparo de soluções intermediárias e soluções de trabalho

As soluções intermediárias e de trabalho foram preparadas em concentrações adequadas nos solventes avaliados conforme os testes executados.

3.1.1.7 Otimização do espectrômetro

A otimização foi feita através da infusão de soluções contendo os analitos 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 senduramicina. As soluções foram introduzidas no instrumento por infusão contínua com bomba de seringa Harvard a um fluxo de 10 µL/min.

3.1.1.8 Estudos de ionização da maduramicina no modo de ionização *Electrospray*

Como descrito na seção 4.1.1, exceto pela maduramicina, todos os íons precursores esperados foram observados durante a otimização do espectrômetro (seção 3.1.1.7). Assim, a fim de efetuar uma investigação sobre a ionização desta substância, alguns experimentos foram conduzidos. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque de maduramicina de amônio na concentração de 100 ng/mL em 80% de MeOH ou ACN e 20% v/v de: FOA 1% (pH 2,1), FOA 0,1% (pH 2,6), FOA 1% e NaOAc 2 mmol/L (pH 2,2), FOA 1% e NH₄OAc 2 mmol/L (pH 2,2), FOA 0,1% e NaOAc 2 mmol/L (pH 2,8), FOA 0,1% e NH₄OAc

2 mmol/L (pH 2,8), FOA 0,05% e NaOAc 2 mmol/L (pH 3,1), FOA 0,05% e NH₄OAc 2 mmol/L (pH 3,1), NaOAc 2 mmol/L (pH 6,9) e NH₄OAc 2 mmol/L (pH 6,5).

As soluções foram introduzidas no instrumento por infusão contínua com bomba de seringa Harvard a um fluxo de 10 µL/min. As condições de análise foram as seguintes:

- Fonte: Turbo V[®], sonda TurbolonSpray[®] (TIS), modo positivo
- Varredura em Q1: CUR Gas (N₂) 10 psi, GS1 (N₂, neb) 20 psi, GS2 (N₂, aquec) 0, IS 5500V, TEM 0, DP 80V, EP 10V, resolução unitária, detector 2200 V, DF -400V.

Uma descrição resumida desse estudo foi apresentada no artigo científico constante do Apêndice C.

3.1.1.9 Estudos de desenvolvimento do método cromatográfico

Diversas fases móveis e três colunas analíticas de diferentes fases estacionárias, com suas respectivas colunas de guarda, foram testadas:

- Polaris[®]C18-A, 100 mm x 2,0 mm, 3 µm (Part No. A2001100X020, Varian);
- ACE 3 C18, 50 mm x 2,1 mm, 3 µm (Part No.ACE-111-0502, Advanced Chromatography Technologies)
- EC 125/3 Nucleosil 100-5 C6H5, 125 mm x 3,0 mm, 5 µm (Part No. 720695.30, Macherey Nagel)

3.1.1.10 Estudos preliminares de linearidade e sensibilidade do sistema CLAE-EM/EM

Soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoques nas concentrações de 1 ng/mL, 2,5 ng/mL 5 ng/mL e 10 ng/mL em 80% de MeOH e 20% v/v de FOA 1% com 2 mmol/L de NaOAc. Essas soluções foram injetadas (10 µL) em condições de eluição isocrática (FOA 0,1% em ACN:FOA 0,1% em H₂O, 95:5, v/v) com fluxo de 0,2 mL/min e 8 min de corrida. Curvas de calibração foram construídas com as áreas das transições mais abundantes (transições de quantificação) como ordenadas e concentrações como abscissas. As razões sinal/ruído foram calculadas para o pico correspondente à transição de confirmação na solução mais diluída.

3.1.1.11 Preparo de amostras

Ovos caipiras orgânicos (Label Rouge Ltda., Porto Feliz, SP) certificados pelo Instituto Biodinâmico (IBD) foram adquiridos para os experimentos de extração. O conteúdo foi homogeneizado em liquidificador e alíquotas de 2 g, 5 g e 10 g foram pesadas em tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL. Essas alíquotas foram armazenadas a $< -20^{\circ}\text{C}$ e descongeladas no dia do uso .

3.1.1.12 Procedimentos de extração/purificação testados

Os procedimentos de extração/purificação testados basearam-se na extração simples com solvente orgânico como a empregada por Mortier, Daeseleire e Van Peteghem (2005), na extração com solvente orgânico acrescida de purificação por extração por fase sólida (EFS) em cartucho de sílica usada por um grande número de autores (ROKKA; PELTONEN, 2006; JESTOI; ROKKA; PELTONEN, 2007; DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002) e na extração com solvente orgânico acrescida de purificação por EFS em cartucho polimérico *Oasis* HLB. O procedimento de Dubreil-Chéneau et al. (2009) foi o último testado e adotado após modificações e está bem detalhado no artigo científico constante do Apêndice C. Todos os experimentos iniciais foram feitos no nível de fortificação de $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$. A Figura 9 apresenta o fluxograma do procedimento mais simples, identificado como Método de Extração 1 e a Figura 10 ilustra o Método de Extração 3. O método 4 consistiu da modificação do método 3 com a eliminação da etapa de agitação com agitador mecânico (*shaker*) após a etapa de agitação com o vórtex. O método 5 (Figura 11) utilizou como cartucho de extração por fase sólida o cartucho polimérico *Oasis* HLB. Uma modificação do Método de Extração 1, com a substituição da acetonitrila por metanol também foi realizada.

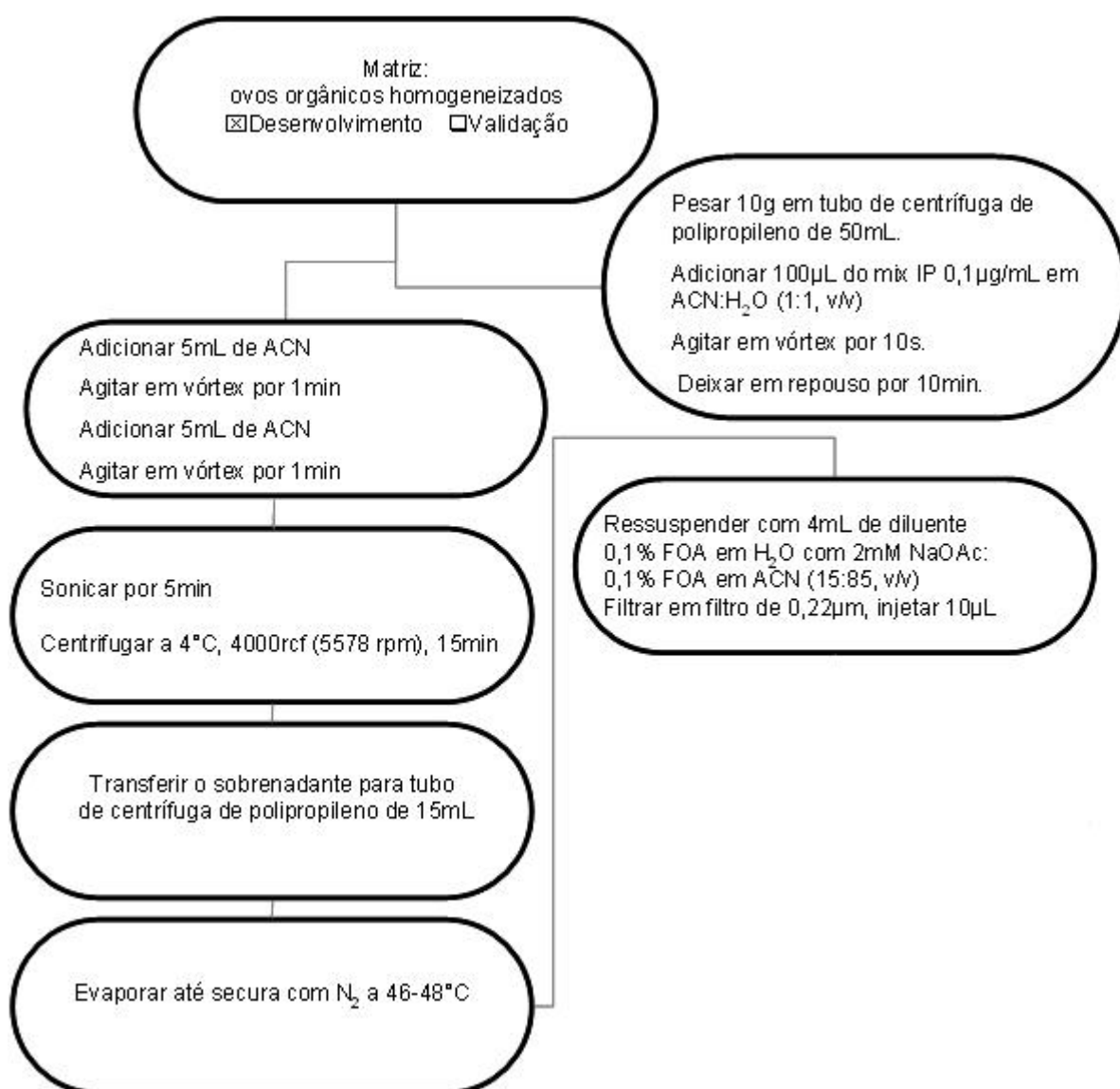


Figura 9. Método de Extração 1 – Fortificação no início do procedimento.

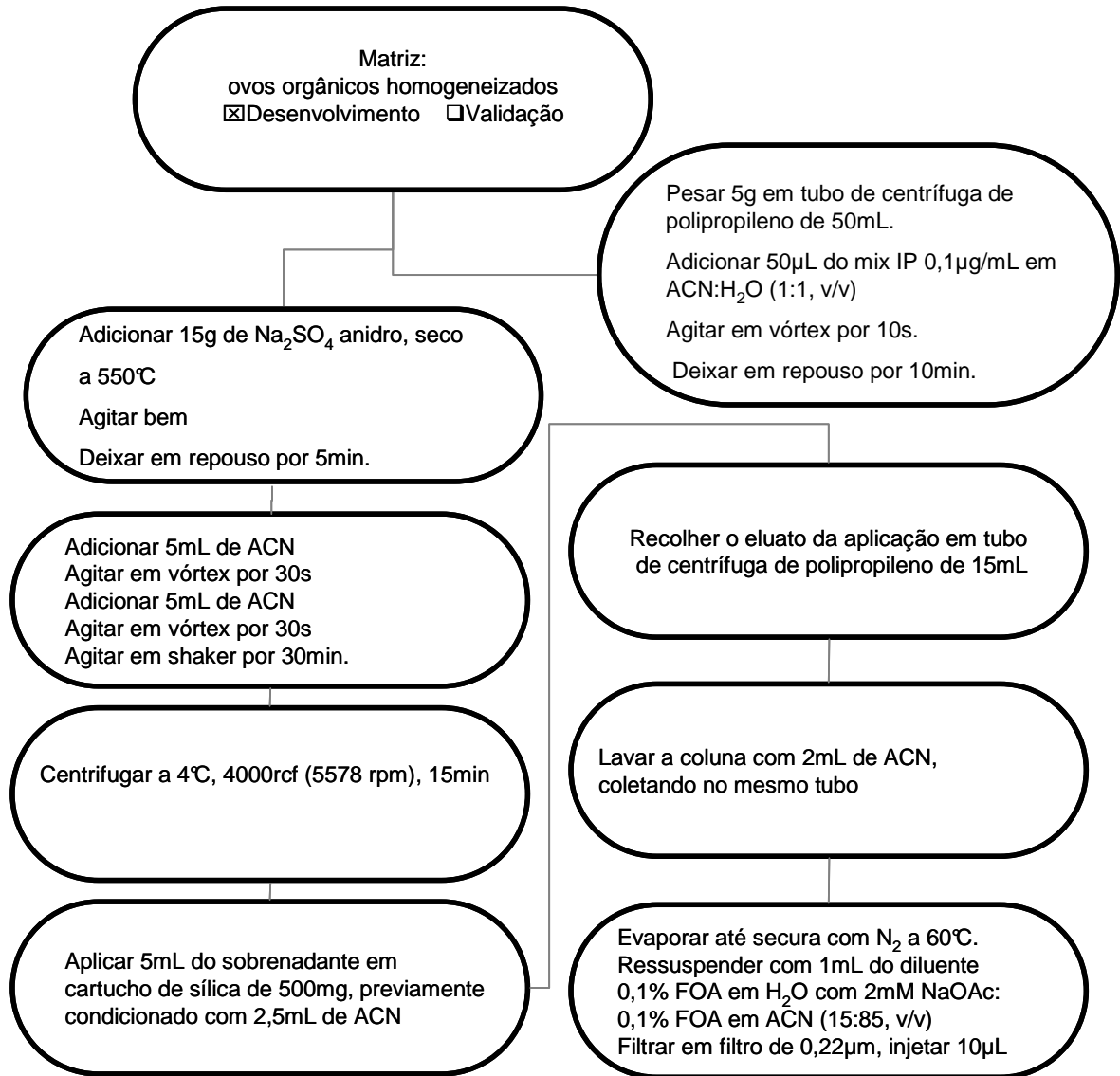


Figura 10. Método de Extração 3 – Fortificação no início do procedimento.

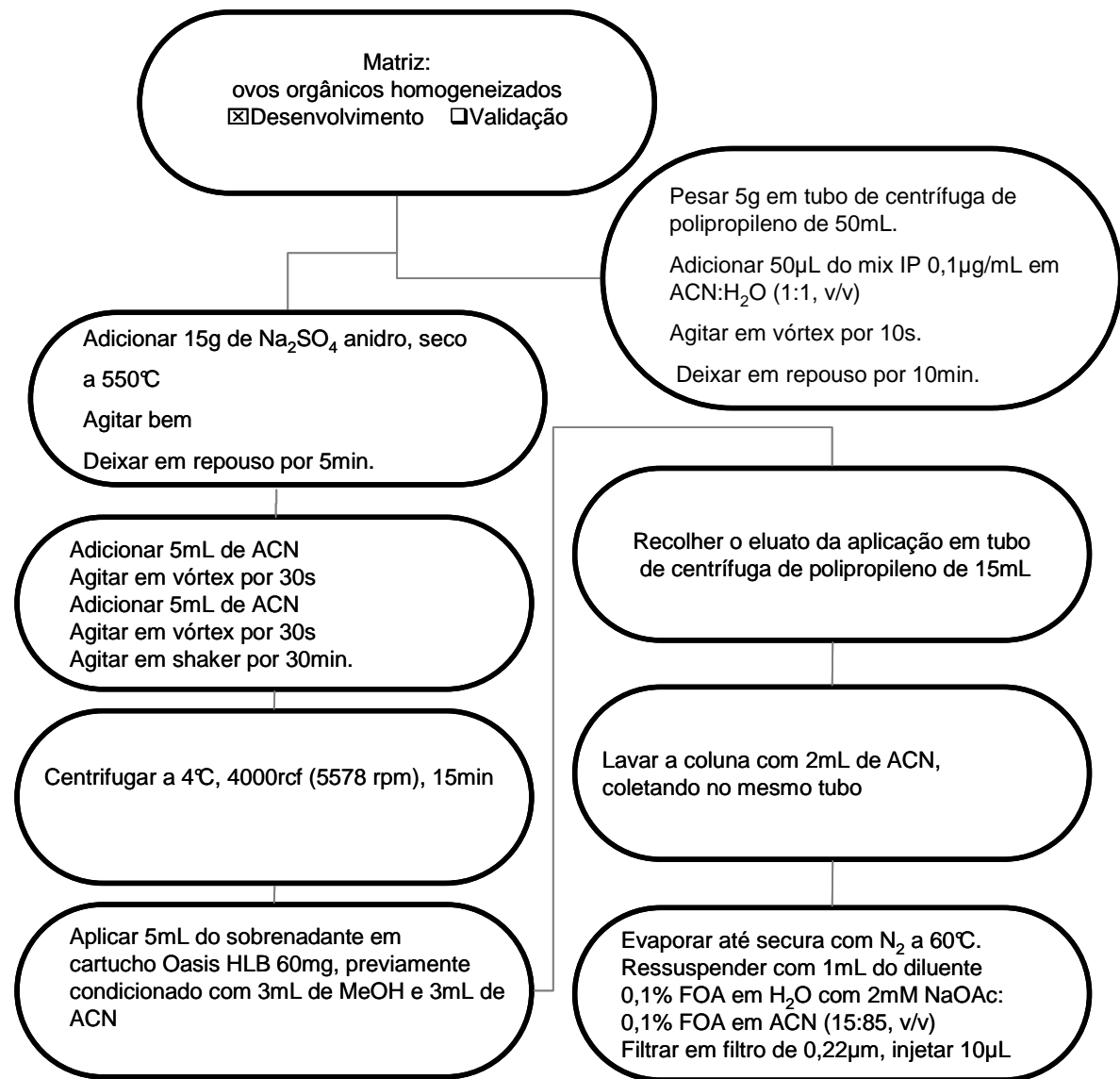


Figura 11. Método de Extração 5 – Fortificação no início do procedimento.

3.1.1.13 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres no solvente de reconstituição preliminar

Uma solução dos ionóforos foi preparada a 2,5 ng/mL em 0,1% de FOA em ACN:0,1% de FOA em H₂O com NaOAc 2 mmol/L pH 3,0 (85:15, v/v). Essa solução foi injetada seguidamente em intervalos de 14 minutos (tempo de corrida), eluição gradiente, em um total de 11 horas de estudo. As soluções foram mantidas a 10°C no *rack* do auto-amostrador para a injeção de 10 µL.

3.1.1.14 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres em diferentes valores de pH

Soluções dos ionóforos foram preparadas a 10 ng/mL em 50% de ACN e 50% v/v de: HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L (pH 3), HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L ajustado a pH 5,5, HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L ajustado a pH 7 e HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L ajustado a pH 10. Todos os ajustes de pH foram feitos com NaOH 1 mol/L. As soluções foram mantidas a 10°C no *rack* do auto-amostrador para a injeção de 10 µL.

3.1.2 Tetraciclinas

3.1.2.1 Padrões

Padrões certificados de oxitetraciclina (OTC), hclato de doxiciclina (DC) e cloridratos de clortetraciclina (CTC) e de demeclociclina (DMC) – usada como padrão interno qualitativo - foram adquiridos da Farmacopéia Americana (Rockville, MD, USA). Cloridrato de tetraciclina (TC) foi empregado da Farmacopéia Brasileira (Santa Maria, RS, Brasil). Metaciclina (MTC), 4-epioxitetraciclina (4-EOTC), 4-epitetraciclina (4-ETC), cloridrato de 4-epiclortetraciclina (4-ECTC), cloridrato de 4-epianidroclortetraciclina (4-EACTC), cloridrato de anidroclortetraciclina (ACTC), cloridrato de isoclortetraciclina (ICTC), alfa-apo-oxitetraciclina (α -AOTC) e beta-apo-oxitetraciclina (β -AOTC) foram fornecidos pela Acros (Pittsburgh, PA, USA).

3.1.2.2 Solventes e Reagentes

Ácido fórmico Suprapur[®] (FOA, Art. No. 11670) e ácido oxálico diidratado p.a. foram adquiridos da Merck. Metanol (MeOH) grau cromatográfico e acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida LC/MS foram os mesmos citados no item 3.1.1.2.

3.1.2.3 Materiais

Cartuchos de extração por fase sólida: Oasis[™] HLB foram os mesmos citados em 3.1.1.3.

3.1.2.4 Equipamentos

Os mesmos equipamentos descritos no item 3.1.1.4 foram empregados.

3.1.2.5 Preparo de soluções-estoque

As massas teóricas que foram pesadas de cada padrão para o preparo das soluções-estoque na concentração nominal de 1000 µg/mL em metanol foram calculadas considerando correções de pureza, teor de água e base livre. O analito DMC foi seco por 3 h, a 60°C e 5 mmHg. A solução de 4-EOTC foi sonicada por 5min para facilitar a solubilização. As soluções estoque foram transferidas para microtubos e estocadas a temperaturas < -70°C em freezer de ultra-baixa temperatura.

3.1.2.6 Preparo de soluções intermediárias e soluções de trabalho

As soluções intermediárias e de trabalho foram preparadas em concentrações adequadas em metanol ou no diluente de reconstituição.

3.1.2.7 Otimização do espectrômetro

A otimização foi feita através da infusão de soluções contendo os analitos a 50 ng/mL em ACN:FOA 0,1% (50:50, v/v). As soluções foram introduzidas no instrumento por infusão contínua com bomba de seringa Harvard a um fluxo de 10 µL/min.

3.1.2.8 Preparo de amostras

Exceto para os experimentos de seletividade, onde diversas amostras de leite cru, ultra-alta temperatura (UAT), em pó e pasteurizado foram empregadas, todos os demais experimentos foram conduzidos com leite orgânico UAT integral. As amostras de leite em pó para análise foram reconstituídas conforme indicado no rótulo do produto.

3.1.2.9 Estudos de desenvolvimento e validação

A descrição completa desses estudos foi apresentada no artigo científico constante do Apêndice B. Os seguintes parâmetros foram avaliados para a validação: seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho (função de calibração), linearidade e sensibilidade (incluindo efeito matriz), acurácia (exatidão e recuperação), precisão (repetitividade, precisão intermediária e análise de MRC), robustez, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), estabilidade dos analitos em solução estoque, estabilidade dos analitos em solução intermediária, estabilidade dos analitos no diluente final de injeção, estabilidade dos analitos na matriz, estabilidade dos analitos no extrato e estabilidade dos analitos no extrato pronto para injeção.

3.2 Amostragem

A estratégia de amostragem foi a aleatória, a fim de que os dados gerados pudessem ter uma significância estatística adequada ao propósito futuro de avaliação da exposição da população selecionada (região metropolitana do Rio de Janeiro) a resíduos dos antibióticos estudados. As recomendações do *Codex Alimentarius* foram adotadas, efetuando-se considerações analíticas e econômicas (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2009). O número de amostras se baseou na adoção de uma confiança de 99% de que a prevalência de resultados não-conformes não excederia uma percentagem de 5%. Assim, como o número mínimo seria de 90 amostras, 100 foram coletadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que os estudos realizados estão apresentados na forma de artigos científicos e esses compõem o corpo da tese na íntegra (Apêndices A, B, C, D e E), somente resultados não incluídos nos artigos ou apresentados de forma muito sucinta (referentes à seção 3.1) serão relatados a seguir.

4.1 Ionóforos poliéteres

4.1.1 Estudos de ionização da maduramicina no modo de ionização *Electrospray*

Uma discussão resumida dos resultados referentes a este estudo foi apresentada no artigo científico constante do Apêndice C.

Devido às informações estruturais fornecidas pela espectrometria de massas sequencial (*tandem mass spectrometry*), essa técnica, acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-EM/EM), tem sido cada vez mais empregada para a confirmação de resíduos e contaminantes em alimentos, matrizes biológicas e ambientais. O modo de aquisição Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) é o mais adequado para a quantificação por sua maior sensibilidade e especificidade. A escolha das transições de MRM deve basear-se em fragmentações que forneçam informações características, preferencialmente de partes distintas das moléculas. Assim, para a obtenção das transições de MRM foi feita uma otimização automática do equipamento (seção 3.1.1.7) de forma a gerar quatro transições para posterior seleção das três mais adequadas.

Antes da otimização a presença das substâncias foi confirmada pela varredura no quadrupolo Q1 (Q1Scan). Como pode ser observado na Figura 12, na faixa de massas m/z 500 a 1000 Da os íons mais abundantes observados foram: m/z 553,4 (?), 567,0 (?), 613,4 (lasalocida A aduto sódico, $[M+Na]^+$), 635,2 (?), 693,4 (monensina A aduto sódico, $[M+Na]^+$), 707,5 (?), 747,6 (nigericina aduto sódico, $[M+Na]^+$), 761,7 (?), 773,6 (salinomocina A aduto sódico, $[M+Na]^+$), 787,8 (narasina A aduto sódico, $[M+Na]^+$) e 953,6 (?). Todas as substâncias foram detectadas, mas o íon equivalente à maduramicina aduto sódico, $[M+Na]^+ = 939,5$ apresentou-se com intensidade bastante reduzida. Os íons m/z 613,4, 693,4, 747,6, 773,6, 787,8, 953,6

e 939,5 foram selecionados para a otimização, considerando que m/z 953,6 fosse referente a algum precursor da maduramicina.

A identidade dos demais íons detectados na varredura no quadrupolo Q1 (Q1Scan), do íon selecionado como precursor da maduramicina e dos íons produtos formados foi tentativamente elucidada através de relatos de referências bibliográficas, cálculos de diferença de massas e de estudos de ionização da maduramicina.

Para a maduramicina não se obteve o íon precursor esperado e como os íons no processo de nebulização e ionização por *electrospray* dependem de uma série de parâmetros, um estudo (descrito na seção 3.1.1.8) foi efetuado para esse analito a fim de avaliar a influência da composição e do pH da fase líquida na geração desses íons, visando a identificação do íon precursor adequado que deve ser selecionado e submetido ao processo de dissociação induzida por colisão (CID) para gerar os íons produtos.

+Q1: 10 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20070405115...

Max. 2.2e7 cps.

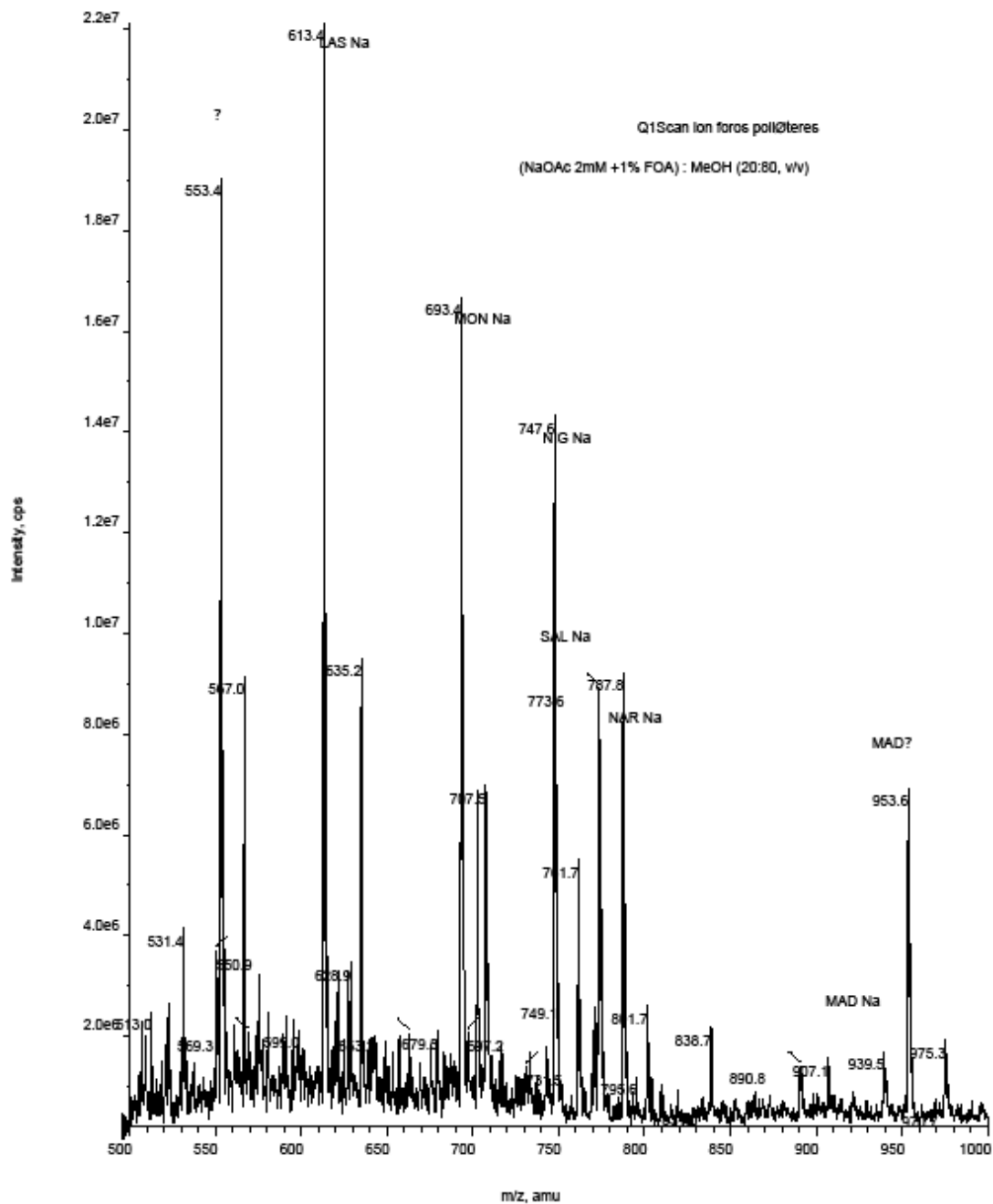


Figura 12. Espectro de massas de uma mistura dos analitos estudados, exceto a senduramicina. Solução a 50 ng/mL no solvente MeOH:NaOAc 2 mmol/L e 1% FOA, 80:20, v/v. A senduramicina foi otimizada individualmente, pois o padrão só foi recebido após os demais.

A formação de vários íons moleculares, indesejada para fins quantitativos, foi observada quando somente acetato de sódio (NaOAc) foi adicionado à fase aquosa, independente do solvente orgânico utilizado. O pico base m/z 961,7 é compatível com o aduto de sódio do sal sódico da maduramicina, $[(M-H+Na)+Na]^+$ e o íon m/z 939,5 com o aduto de sódio do ácido livre $[M+Na]^+$ (Figura 13). Quando o NaOAc foi substituído por acetato de amônio (NH₄OAc), o aduto de amônio do ácido livre, $[M+NH_4]^+$, m/z 934,5, foi formado preferencialmente, seguido dos adutos de sódio $[M+Na]^+$ m/z 939,5 e de potássio $[M+K]^+$ m/z 955,5, tanto em MeOH ou ACN (Figura 14). Quando o ácido fórmico (FOA), puro ou acrescido dos sais de sódio e amônio, foi utilizado em conjunto com o MeOH, íons distintos dos obtidos até então e dos obtidos com as mesmas soluções aquosas com o modificador ACN puderam ser observados: m/z 948,5, 953,6 e 969,5 (Figura 15). Considerando-se que esses íons não foram detectados com acetonitrila, eles foram tentativamente identificados respectivamente, como o aduto de metanol do ácido livre $[M+CH_3OH]^+$, o aduto de sódio do éster metílico da maduramicina $[(M-H+CH_3)+Na]^+$ e o aduto de potássio do éster metílico da maduramicina sal de amônio $[(M-NH_4+CH_3)+K]^+$.

A maduramicina tem afinidade muito maior pelo Na⁺ do que NH₄⁺, pois com NaOAc/HOAc não se observou o aduto de MeOH verificado com a mesma concentração de NH₄OAc. Com NaOAc também foi mais abundante o íon m/z 975,7 (não identificado), cuja intensidade foi maior conforme o aumento do pH.

As condições de ionização na sonda TIS e o excesso de MeOH na solução possibilitam a esterificação da função ácida da maduramicina, catalisada pelo FOA. O uso de ACN é mais adequado, mas considerando-se que MeOH pode ser utilizado como solvente na fase móvel no método cromatográfico, a possibilidade de esterificação não pode ser desprezada.

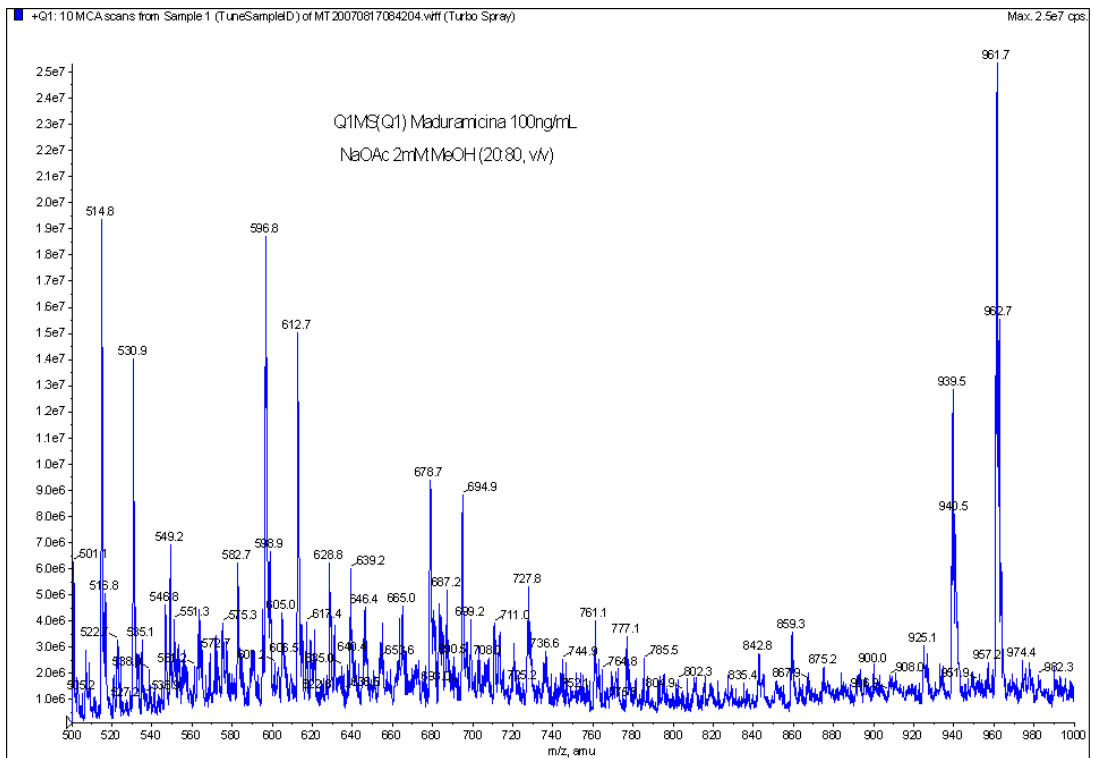


Fig. 13. Espectro de massas da maduramicina em solução a 100 ng/mL em NaOAc 2 mmol/L e MeOH (20:80, v/v).

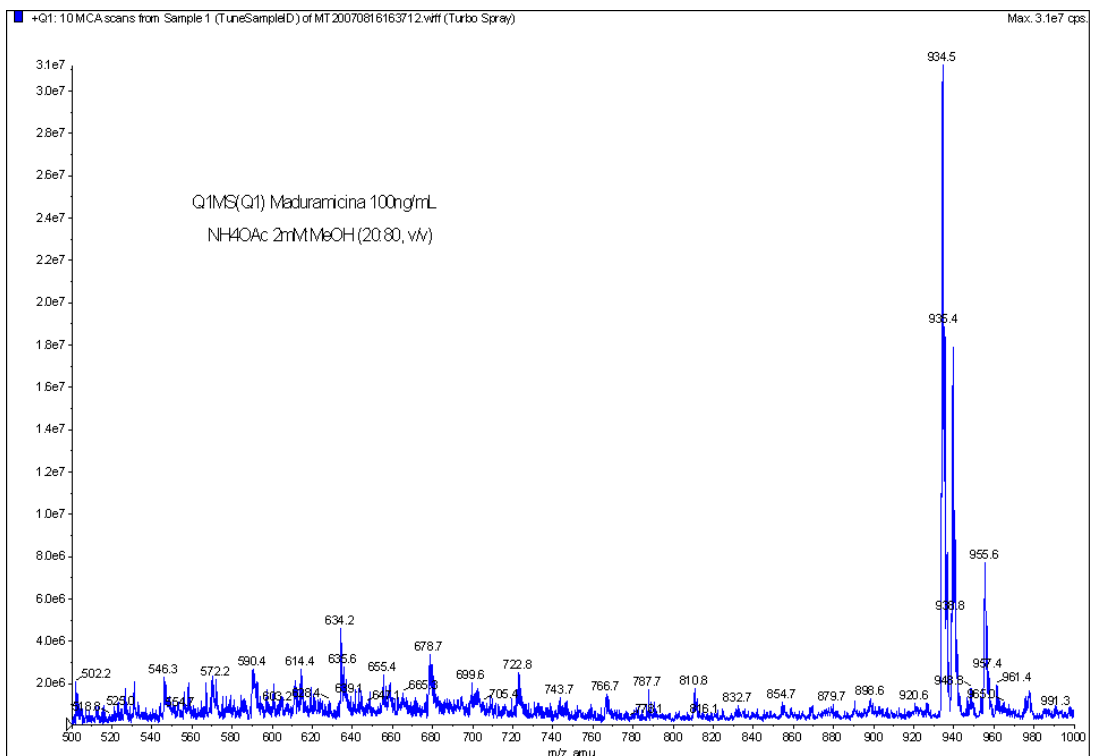


Figura 14. Espectro de massas da maduramicina em solução a 100 ng/mL em NH₄OAc 2 mmol/L e MeOH (20:80, v/v).

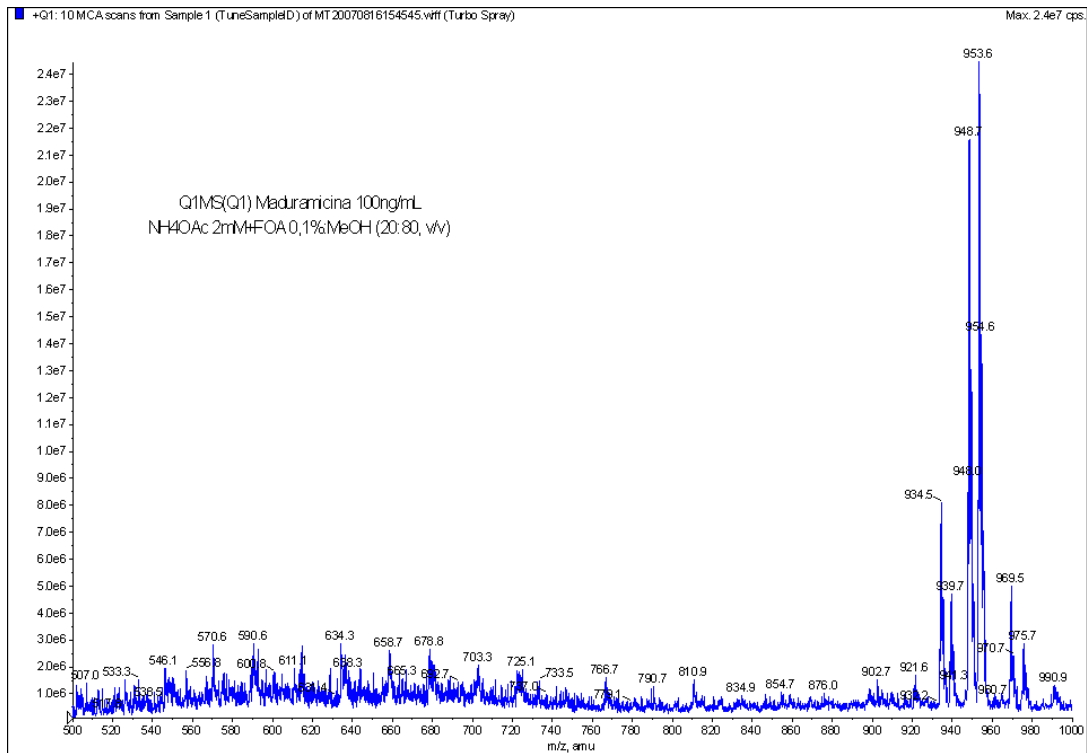


Figura 15. Espectro de massas da maduramicina em solução a 100 ng/mL em NH₄OAc 2 mmol/L com FOA 0,1% e MeOH (20:80, v/v).

4.1.2 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (estudos de desenvolvimento do método cromatográfico)

Os primeiros testes de desenvolvimento do método cromatográfico foram efetuados com a coluna analítica Polaris[®]C18-A, com fase móvel consistindo de 0,1% FOA em H₂O com 2 mmol/L de NaOAc (fase móvel A) e 0,1% FOA em ACN (fase móvel B). Métodos de eluição isocráticos com até 90% de B possibilitaram a detecção de todos os analitos em uma solução a 0,5 ng/mL (em MeOH:NaOAc 2 mmol/L e 1% FOA, 80:20, v/v), exceto a lasalocida. Para a maduramicina, monensina, narasina e salinomicina foram observados picos de isômeros antecedendo os picos dos analitos (Figura 16). A lasalocida não foi detectada nessa concentração nem na concentração dez vezes superior, o que levou a testes com soluções contendo somente esse analito a 500 ng/mL. Picos extremamente largos e com cauda foram obtidos. Diferentes valores de pH (2,3, 4,0 e 6,5) da solução de injeção não alteraram o perfil de eluição da lasalocida. Fases móveis contendo 1% ao invés de 0,1% de FOA não alteraram a simetria dos picos, somente provocaram ligeira redução dos tempos de retenção. A adição de metanol acidificado com FOA

na fase móvel contendo acetonitrila melhorou a eluição do analito na coluna, mas o pico ainda apresentou-se extremamente assimétrico. Assim, decidiu-se testar outra coluna, a ACE 3C18. Picos simétricos foram obtidos para todos os analitos, inclusive para a lasalocida, quando uma solução a 10 ng/mL (em MeOH:NaOAc 2 mmol/L e 1% FOA, 80:20, v/v) foi injetada com fase móvel consistindo de 0,1% FOA em H₂O (fase móvel A) e 0,1% FOA em ACN (fase móvel B). Com eluição isocrática a 95% de B todos os analitos eluíram em menos de 5 minutos, mas os picos dos isômeros da narasina e da salinomicina anteriormente verificados com as condições analíticas testadas na coluna Polaris não foram observados. Outras condições foram então avaliadas, visando a obtenção de um método rápido, com picos simétricos e que possibilitasse a identificação dos isômeros. Fases móveis aquosas com 0,1% FOA, 2% HOAc e 2% HOAc com 2 mmol/L de NH₄OAc com fases móveis orgânicas compostas de 0,1% FOA em ACN, 0,1% FOA em MeOH, 2% HOAc em ACN e 2% HOAc com 2mmol/L de NH₄OAc em ACN foram empregadas. As Figuras 17 e 18 apresentam os cromatogramas de alguns dos melhores métodos. O uso de ácido acético como aditivo na fase móvel não trouxe benefícios em relação ao ácido fórmico. A adição de acetato de amônio na fase contendo ácido acético provocou a coeluição da nigericina com a maduramicina. O gradiente apresentado na Tabela 12 e identificado como gradiente 8 na Figura 17 foi um dos melhores obtidos em função de oferecer uma maior resolução em relação ao isômero da salinomicina, além de boa simetria da lasalocida. A ordem de eluição foi a seguinte: lasalocida (LAS), senduramicina (SEND), salinomicina (SAL), monensina (MON), narasina (NAR), maduramicina (MAD) e nigericina (NIG), com eluição de todos os analitos em até sete minutos.

Tabela 12. Gradiente 8.

Tempo (min)	% FOA 0,1% em H ₂ O	% FOA 0,1% em ACN
0	15	85
2	5	95
2,5	5	95
4,5	0	100
7,0	0	100
7,5	15	85
10	15	85
10	Stop	

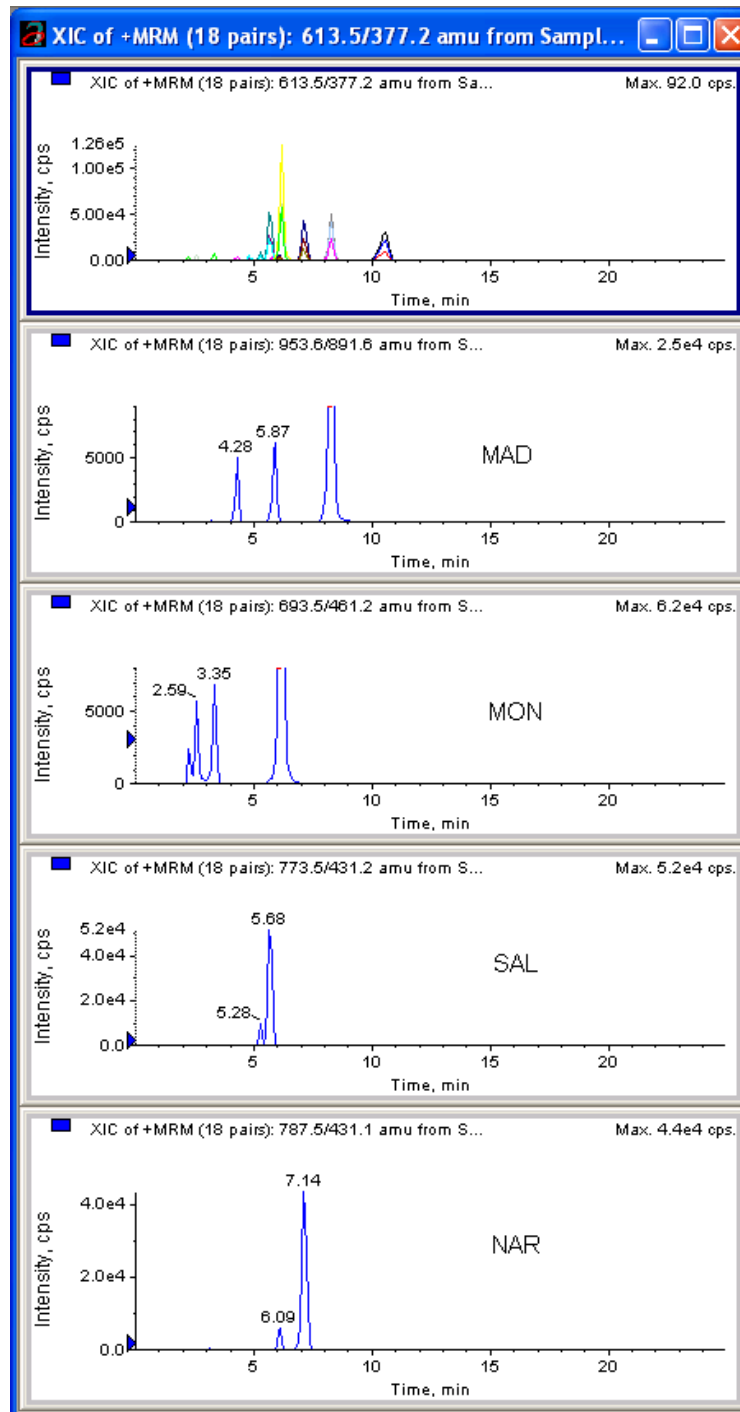


Fig 16. Injeção de solução a 0,5ng/mL (em MeOH:NaOAc 2 mmol/L e 1% FOA, 80:20, v/v), em coluna Polaris®C18-A, com fase móvel consistindo de 0,1% FOA em H₂O com 2 mmol/L de NaOAc : 0,1% FOA em ACN (10:90, v/v).

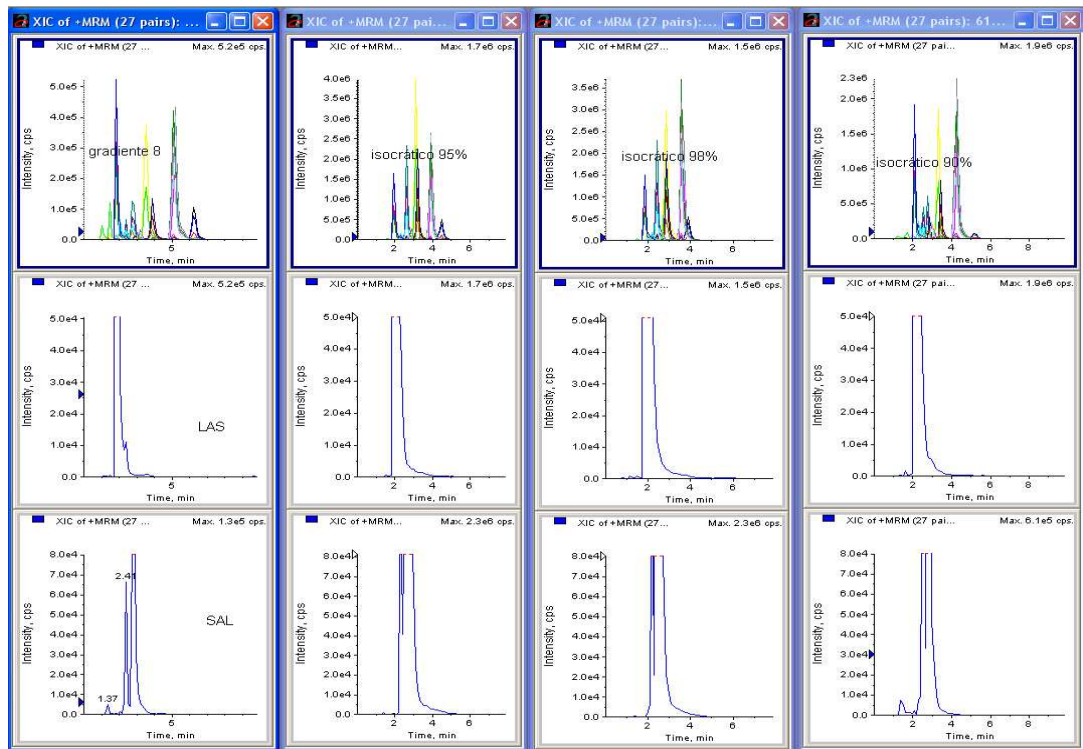


Figura 17. Comparação dos melhores métodos obtidos com 0,1% FOA na fase móvel.

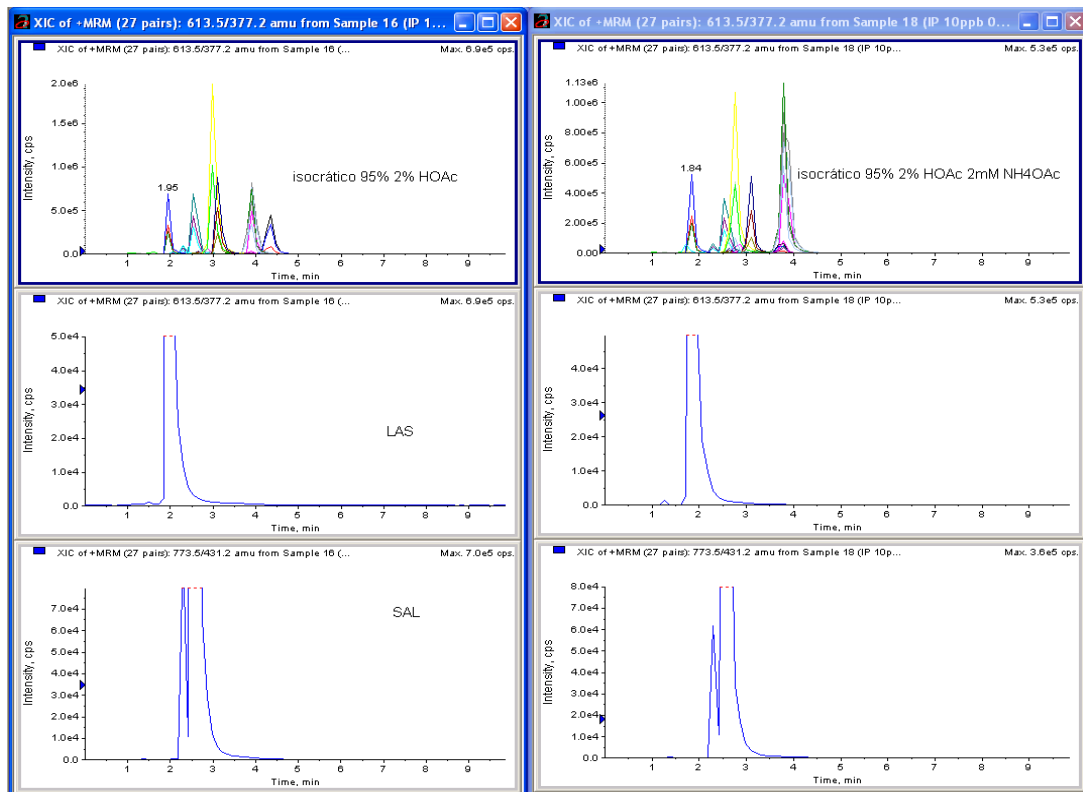


Figura 18. Comparação dos melhores métodos obtidos com 2% HOAc na fase móvel.

A modificação do gradiente 8 conforme apresentado na Tabela 13 forneceu uma simetria superior ao pico da nigericina. Caso o objetivo se limitasse à determinação dos ionóforos poliéteres, essa seria a programação de eluição gradiente adotada.

A coluna fenil não forneceu boa separação dos analitos e nem picos mais simétricos.

Tabela 13. Gradiente obtido pela modificação do gradiente 8.

Tempo (min)	% FOA 0,1% em H ₂ O	% FOA 0,1% em ACN
0	15	85
2	5	95
2,5	5	95
4,5	0	100
7,5	0	100
8,0	15	85
13	15	85
13	Stop	

As discussões referentes ao desenvolvimento do método cromatográfico final, com a inclusão dos macrolídeos e da lincomicina encontram-se descritas no artigo científico constante do Apêndice C.

4.1.3 Avaliação preliminar de linearidade e sensibilidade do sistema CLAE-EM/EM

As curvas analíticas obtidas a partir das soluções dos ionóforos poliéteres nas concentrações de 1 a 10 ng/mL apresentaram maior dispersão dos resultados com o aumento da concentração, indicando heteroscedasticidade. Não foram observados indícios de desvios de linearidade. A avaliação definitiva da linearidade e sensibilidade do sistema CLAE-EM/EM, incluindo os macrolídeos e a lincomicina encontram-se no artigo presente no Apêndice C.

Os cálculos de razão sinal/ruído (S/N) para a segunda transição, com base na solução de concentração 1 ng/mL indicaram que as curvas analíticas poderiam ser construídas com níveis mais baixos, considerando-se que o maior limite de quantificação (S/N=10) obtido para o instrumento foi de 0,17 ng/mL para a senduramicina.

A Tabela 14 apresenta uma estimativa dos limites de detecção (LOD, S/N=3) e limites de quantificação (LOQ, S/N=10) do sistema obtidos nas condições analíticas empregadas descritas na seção 3.1.1.10.

Tabela 14. Estimativa dos limites de detecção (LOD, S/N=3) e limites de quantificação (LOQ, S/N=10) do sistema CLAE-EM/EM nas condições analíticas descritas na seção 3.1.1.10.

Analito	Limite de detecção	Limite de quantificação
	(LOD) (ng/mL)	(LOQ) (ng/mL)
Lasalocida	0,016	0,050
Maduramicina	0,038	0,130
Monensina	0,025	0,082
Narasina	0,049	0,164
Nigericina	0,012	0,041
Salinomicina	0,005	0,016
Senduramicina	0,050	0,170

4.1.4 Procedimentos de extração/purificação

O primeiro procedimento de extração testado (Método de Extração 1) foi o mais simples, sem purificação por extração por fase sólida (EFS) com base no publicado por Mortier, Daeseleire e Van Peteghem (2005). Esses autores apresentaram um método capaz de detectar resíduos de quatro ionóforos, sem incluir a maduramicina e a senduramicina. Como a temperatura de evaporação empregada, 46-48°C, foi bem inferior à utilizada pelos autores, 60°C, o tempo para evaporação dos 12mL do extrato límpido amarelado obtido foi muito grande.

Uma modificação do Método de Extração 1, com a substituição da acetonitrila por metanol, forneceu extratos turvos com gordura aparente na superfície, inadequados para injeção mesmo após a filtração, demonstrando que a acetonitrila é muito mais apropriada para a precipitação das proteínas e das gorduras.

Os procedimentos com etapas de purificação por EFS empregando cartuchos de sílica após extrações com acetonitrila foram designados como Métodos de Extração 3 e 4. O Método de Extração 3 é o método empregado por Matabudul, Lumley e Points (2002), mas com uma temperatura de evaporação superior à usada pelos autores (40°C). Dubois, Pierret e Delahaut (2004) empregaram o mesmo

método, mas com quantidades diferentes de sulfato de sódio (10 g), de acetonitrila para a extração (15 mL) e tempo superior de agitação (60 min). Rokka e Peltonen (2006) usaram um volume ainda maior de acetonitrila (20 mL), mas efetuaram a evaporação do eluato à temperatura ambiente. Jestoi, Rokka e Peltonen (2007) empregaram o mesmo método de Rokka e Peltonen (2006), com a inclusão da maduramicina. Nenhum desses autores analisou a senduramicina.

As recuperações médias foram obtidas para extrações em duplicata e os cálculos de recuperação foram efetuados considerando-se amostras brancas extraídas ressuspensas em solução padrão (fortificação no final) de forma que a concentração final para injeção fosse equivalente a 100% de recuperação (2,5 ng/mL). A Tabela 15 apresenta um resumo dos resultados obtidos com os métodos de extração testados. As Figuras 19 a 22 apresentam como ilustração os cromatogramas de MRM da lasalocida para os métodos de extração 1, 3, 4 e 5, respectivamente. Embora as recuperações dos métodos 1 e 5 tenham sido muito semelhantes para essa substância, no método de extração 1 (Figura 19), há significativo efeito de matriz com supressão de sinal, como pode ser observado pelo sinal do analito no cromatograma da fortificação no final ($8,0 \times 10^3$ cps para a primeira transição) quando comparado aos métodos de extração 3, 4 e 5 (Figuras 20, 21 e 22), onde os sinais obtidos foram respectivamente de $2,0 \times 10^5$, $1,4 \times 10^5$ e $1,14 \times 10^5$ cps para a primeira transição. Isso foi observado também para a senduramicina, a segunda a eluir da coluna após a lasalocida, demonstrando que o efeito matriz é mais pronunciado para as substâncias mais polares. Esse efeito se deve à precária purificação do método de extração 1, que não inclui uma etapa de extração por fase sólida. Substâncias presentes nas amostras, embora não detectadas, suprimem o sinal dos analitos de interesse por competição na fonte de íons.

Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos com os métodos de extração testados.

Substância	Método	Recuperação média (%)	RSD (%)
Lasalocida	1 ^a	39,9	12,9
	3 ^b	61,1	12,9
	4 ^c	70,7	25,2
	5 ^d	38,0	5,8
Maduramicina	1 ^a	93,2	3,4
	3 ^b	156,3	7,8
	4 ^c	109,6	5,6
	5 ^d	80,1	2,1
Salinomicina	1 ^a	67,5	4,3
	3 ^b	121,0	18,3
	4 ^c	106,5	19,0
	5 ^d	55,7	1,4
Monensina	1 ^a	74,3	0,2
	3 ^b	96,0	9,1
	4 ^c	103,1	8,2
	5 ^d	64,2	3,0
Narasina	1 ^a	90,2	2,3
	3 ^b	176,3	18,1
	4 ^c	121,1	15,2
	5 ^d	62,7	0,7
Nigericina	1 ^a	43,9	0,8
	3 ^b	60,9	12,0
	4 ^c	53,6	13,6
	5 ^d	60,2	2,0
Senduramicina	1 ^a	89,2	13,4
	3 ^b	88,5	6,7
	4 ^c	99,3	13,8
	5 ^d	170,5	3,2

^a Extração com ACN, sem Na₂SO₄, sem EFS; ^b Extração com ACN, com Na₂SO₄, vórtex, *shaker*, EFS com SiOH; ^c Extração com ACN, com Na₂SO₄, vórtex, EFS com SiOH; ^d Extração com ACN, com Na₂SO₄, vórtex, *shaker*, EFS com Oasis HLB.

O método 3 apresentou recuperações bem superiores a 100% para a maduramicina, salinomicina e narasina e valores de RSD bem semelhantes aos do método 4 para a maioria dos analitos, exceto para a lasalocida e senduramicina. O método 4 apresentou recuperações acima de 70% e abaixo de 110% para todas as substâncias, com exceção da nigericina com 53% e narasina com 121%. Entretanto, os desvios foram significativos.

O método 5 apresentou as menores recuperações, exceto para nigericina e senduramicina e os menores RSD, exceto para a monensina e nigericina, devido à própria natureza da fase ou à melhor qualidade, seja em função de contaminantes metálicos ou de empacotamento.

Em função dos resultados obtidos, novos testes foram efetuados até a adoção do procedimento descrito no artigo constante do Apêndice C.

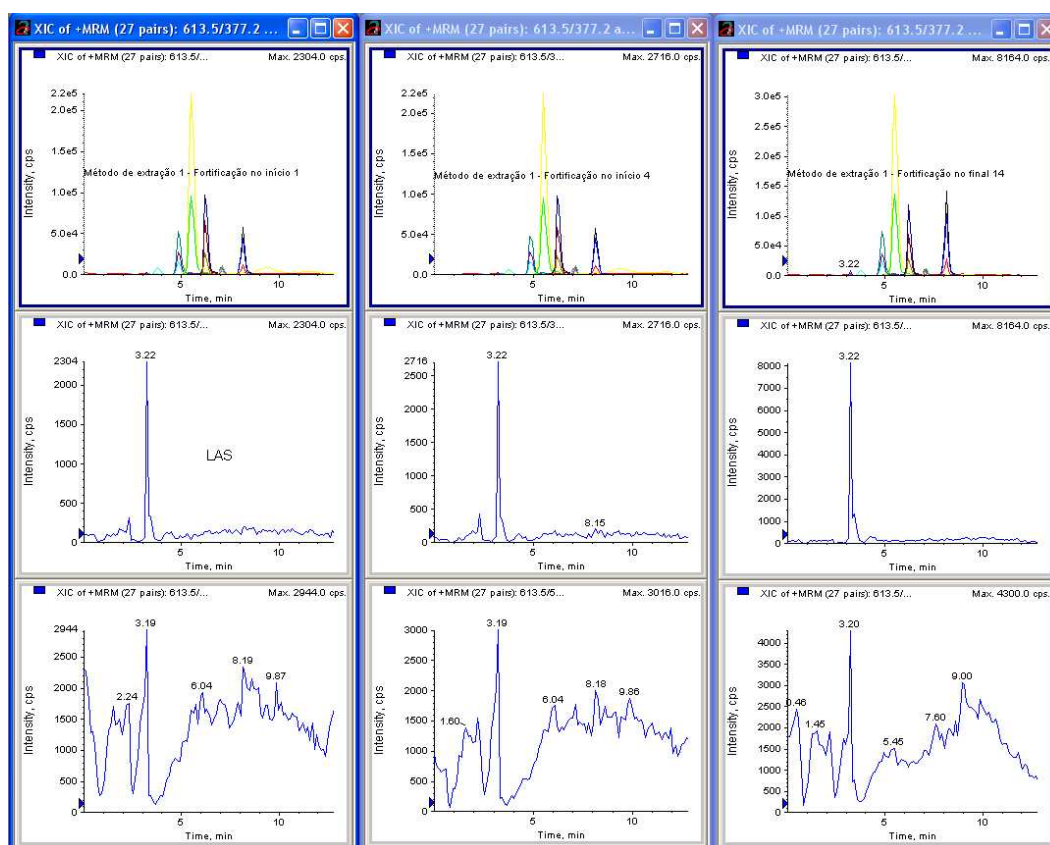


Figura 19. Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 1.

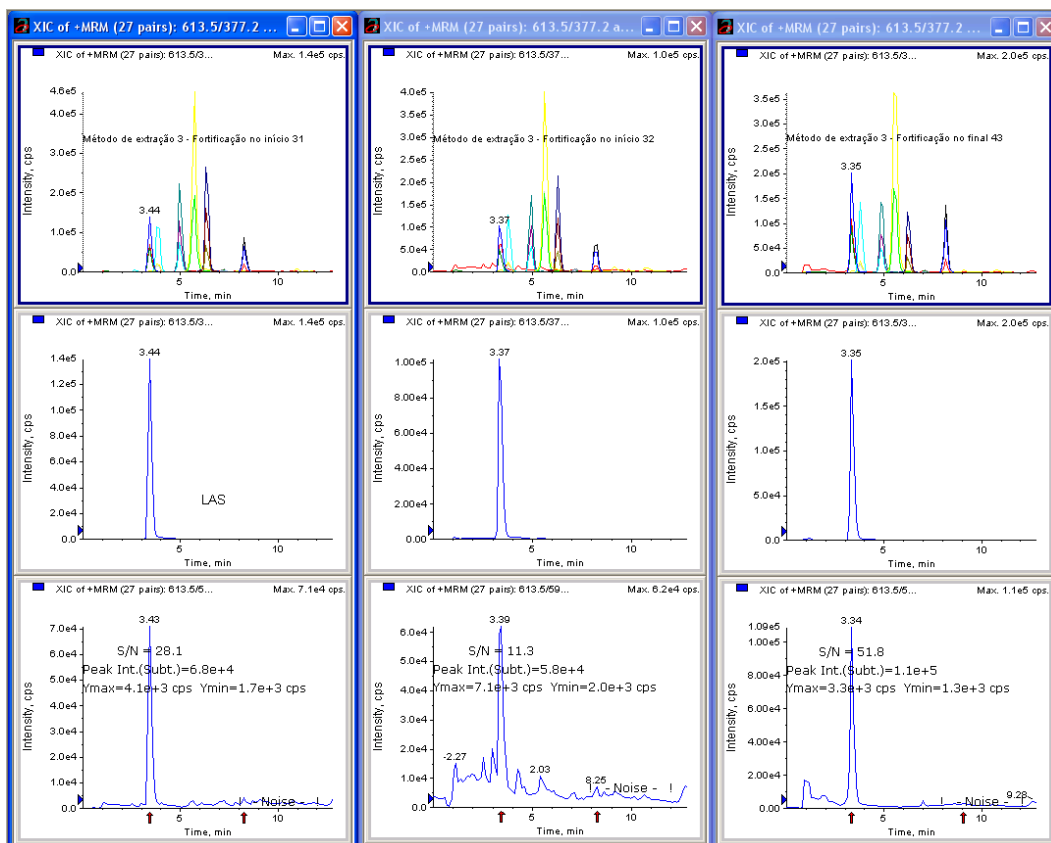


Figura 20. Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 3.

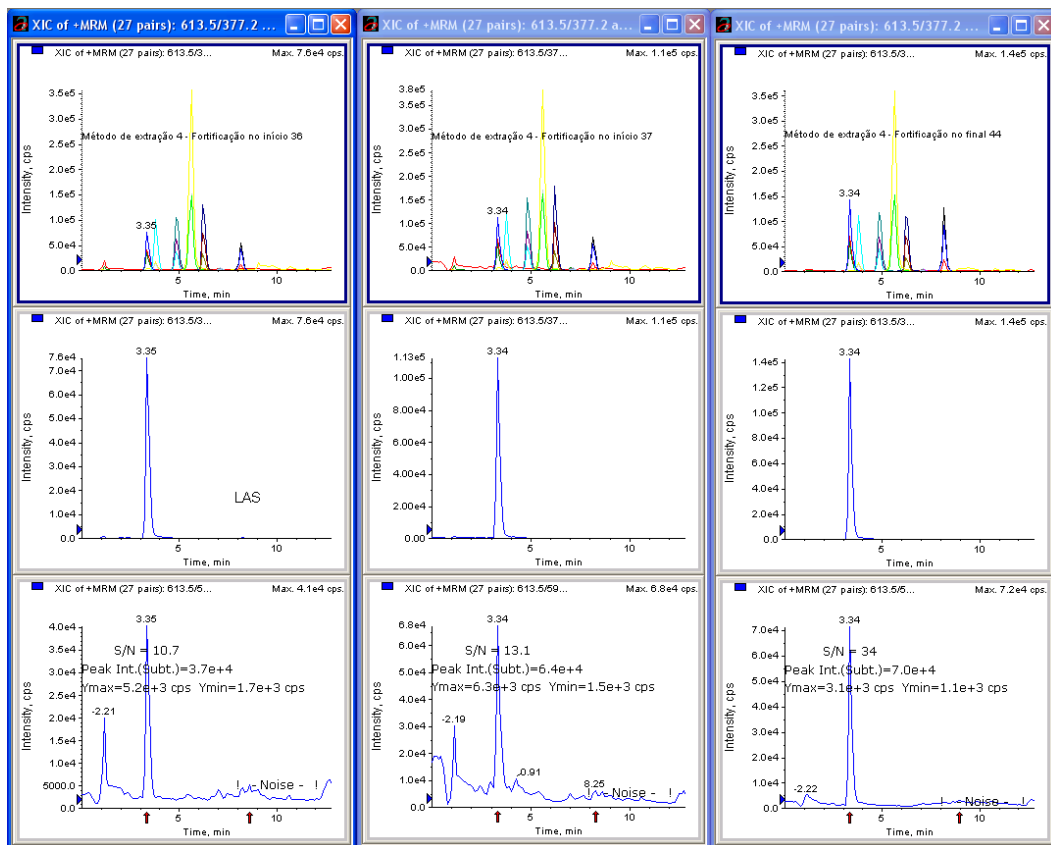


Figura 21. Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 4.

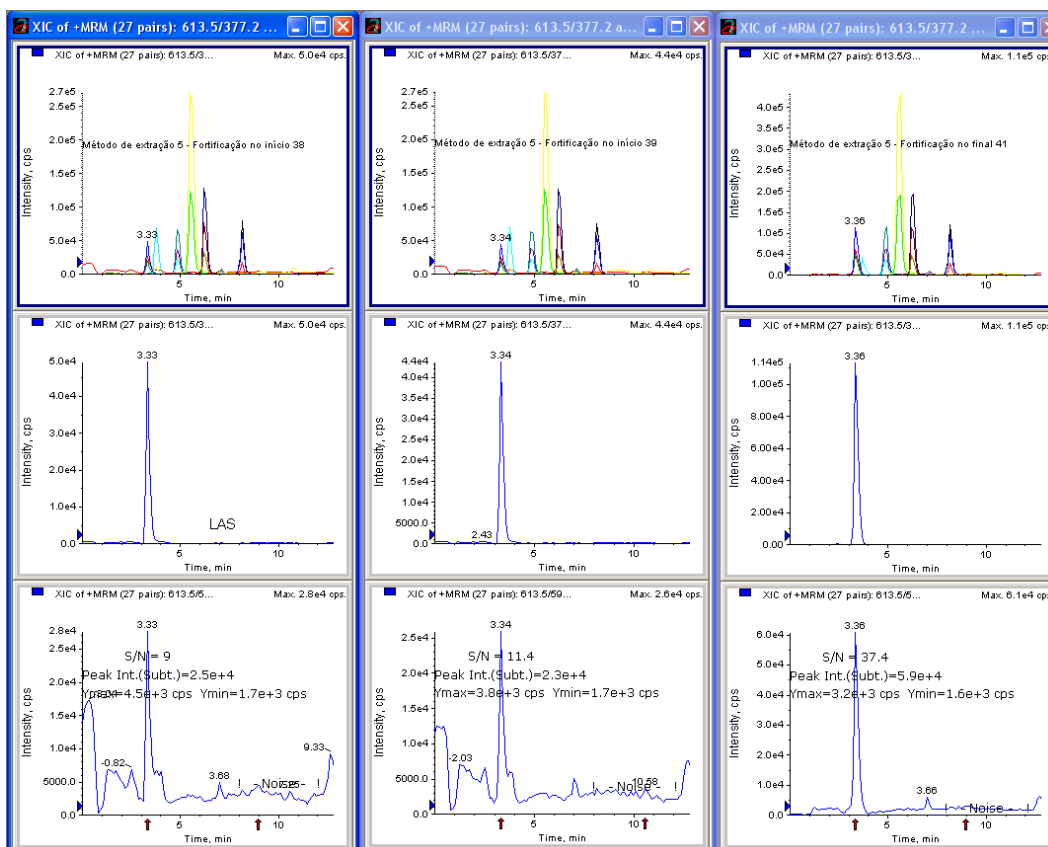


Figura 22. Cromatogramas de MRM da lasalocida para o método de extração 5.

4.1.5 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres no solvente inicialmente escolhido para a reconstituição dos extratos

As Figuras 23 a 28 apresentam os perfis de estabilidade dos analitos no estudo de 11 horas de duração com a solução a 2,5 ng/mL em 0,1% de FOA em ACN: 0,1% de FOA em H₂O com NaOAc 2 mmol/L pH 3,0 (85:15, v/v). Pode-se observar uma degradação em torno de 20% para a LAS. Para a MAD o sinal praticamente dobrou até aproximadamente 2 h, quando começou a cair em seguida. SAL, MON e NAR tiveram perfis semelhantes, mas o acréscimo de sinal foi muito maior para a NAR. O acréscimo de sinal observado para MAD, SAL, MON e NAR indica que a formação do complexo com o íon sódio não foi imediata nas condições testadas. De fato, as substâncias não se encontram presentes como ânions desprotonados em pH 3. Entretanto, como é relatado na literatura, o envolvimento do grupo carboxílico ionizado não é sempre essencial para a ligação metálica. SEN mostrou-se relativamente estável e NIG o mais estável dos analitos no solvente testado, demonstrando um comportamento diferenciado das demais substâncias. Outros solventes de reconstituição foram avaliados até a escolha do MeOH:NaOAc

5 mmol/L (30:70, v/v), conforme descrito no artigo científico constante do Apêndice C. O acréscimo de sinal observado no solvente preliminar não foi observado no diluente final.

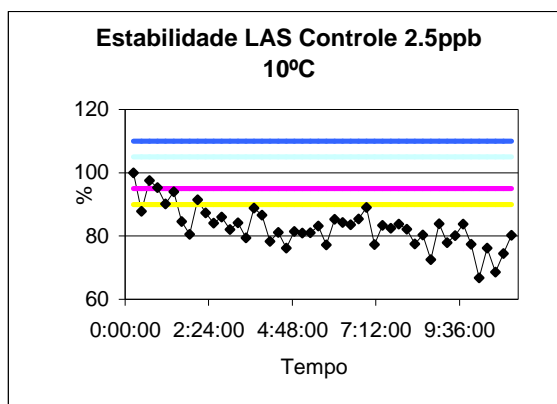


Figura 23. Perfil de estabilidade da LAS no solvente de reconstituição (pH 3).

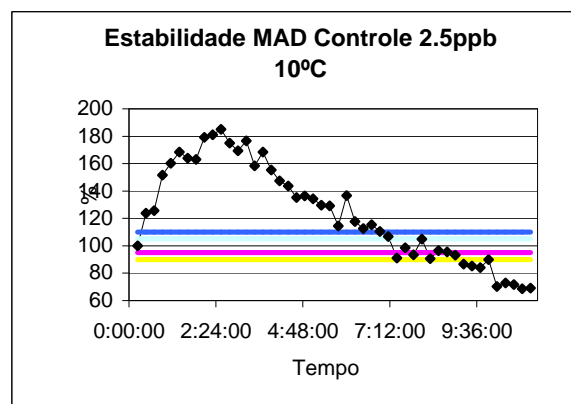


Figura 24. Perfil de estabilidade da MAD no solvente de reconstituição (pH 3).

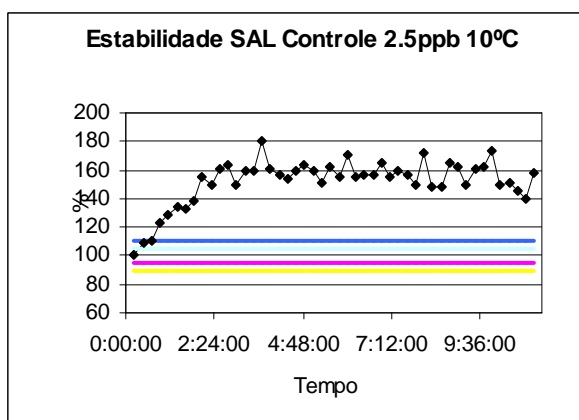


Figura 25. Perfil de estabilidade da SAL no solvente de reconstituição (pH 3).

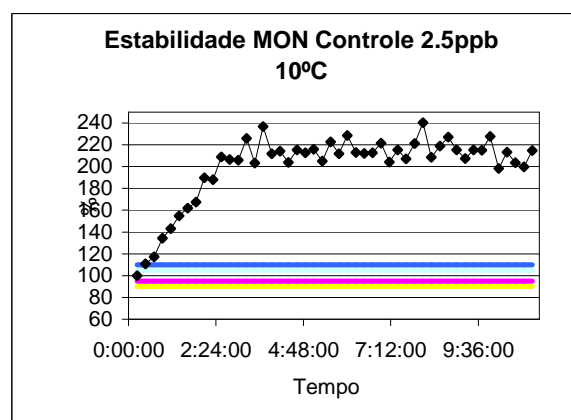


Figura 26. Perfil de estabilidade da MON no solvente de reconstituição (pH 3).

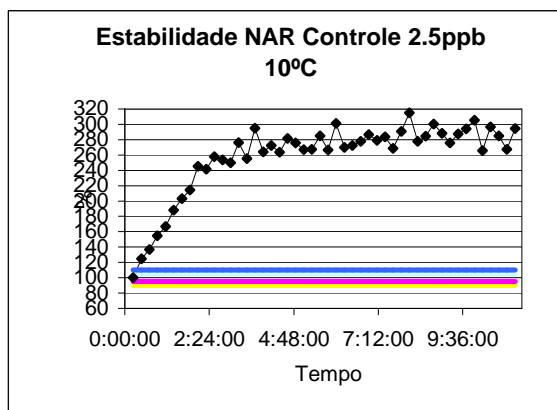


Figura 27. Perfil de estabilidade da NAR no solvente de reconstituição (pH 3).

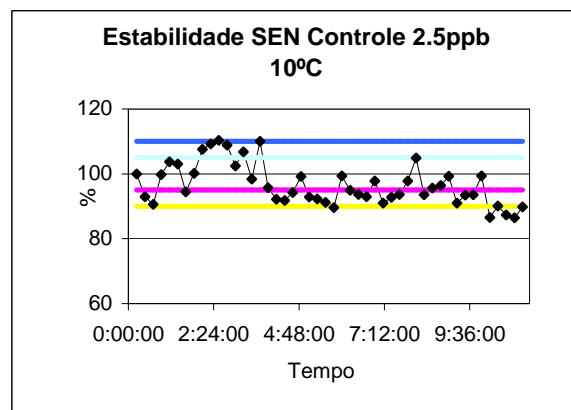


Figura 28. Perfil de estabilidade da SEN no solvente de reconstituição (pH 3).

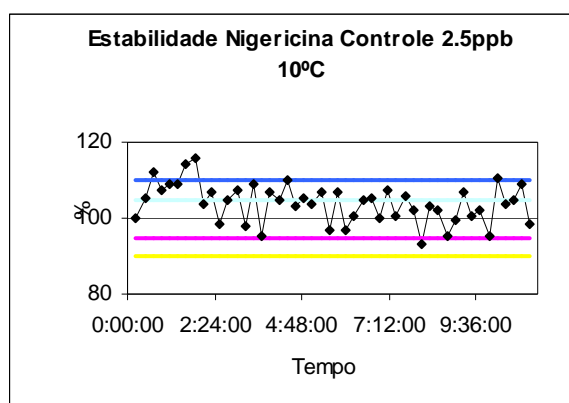


Figura 29. Perfil de estabilidade da NIG no solvente de reconstituição (pH 3).

4.1.6 Estudos de estabilidade dos ionóforos poliéteres em diferentes valores de pH

As soluções dos ionóforos a 10 ng/mL foram preparadas nos solventes como descrito na seção 3.1.1.14. A Tabela 16 resume as composições de cada solvente.

Tabela 16. Identificação dos solventes em função de sua composição.

Solvente n°	Composição
1	ACN/HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L pH 3 (50:50, v/v)
2	ACN/HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L ajustado a pH 5,5 (50:50, v/v)
3	ACN/HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L ajustado a pH 7 (50:50, v/v)
4	ACN/HOAc 1% e NaOAc 2 mmol/L ajustado a pH 10 (50:50, v/v)

Para a lasalocida o equilíbrio de formação do complexo com sódio só foi alcançado em aproximadamente 2 h e não observou-se degradação durante o período do estudo em nenhum dos valores de pH (Figura 30). Para a maduramicina degradação acentuada foi observada somente em pH 3 (Figura 31). Para a monensina, narasina, salinomicina, senduramicina e nigericina o pH de maior estabilidade foi o pH 10. A Figura 32 apresenta, para ilustração, o perfil de estabilidade obtido da senduramicina, após injeções efetuadas em intervalos de aproximadamente 1 h. Caso a metodologia se limitasse aos ionóforos, o solvente n° 4 (Tabela 16) seria o mais indicado entre os testados. Entretanto, como os macrolídeos e a lincomicina foram acrescentados à metodologia, outro solvente foi utilizado para a ressuspensão dos extratos (vide artigo Apêndice C).

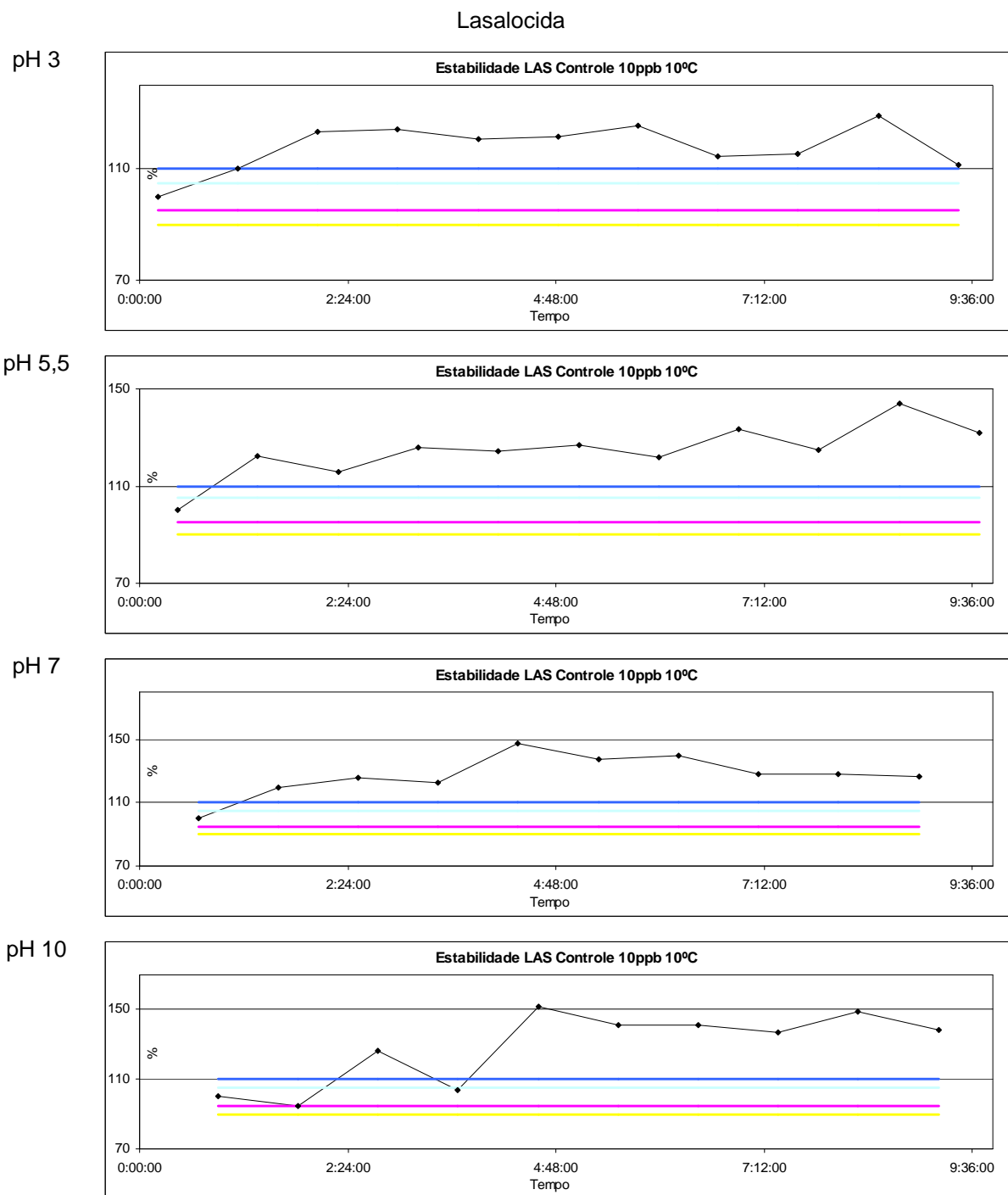


Figura 30. Perfil de estabilidade da LAS em diversos valores de pH.

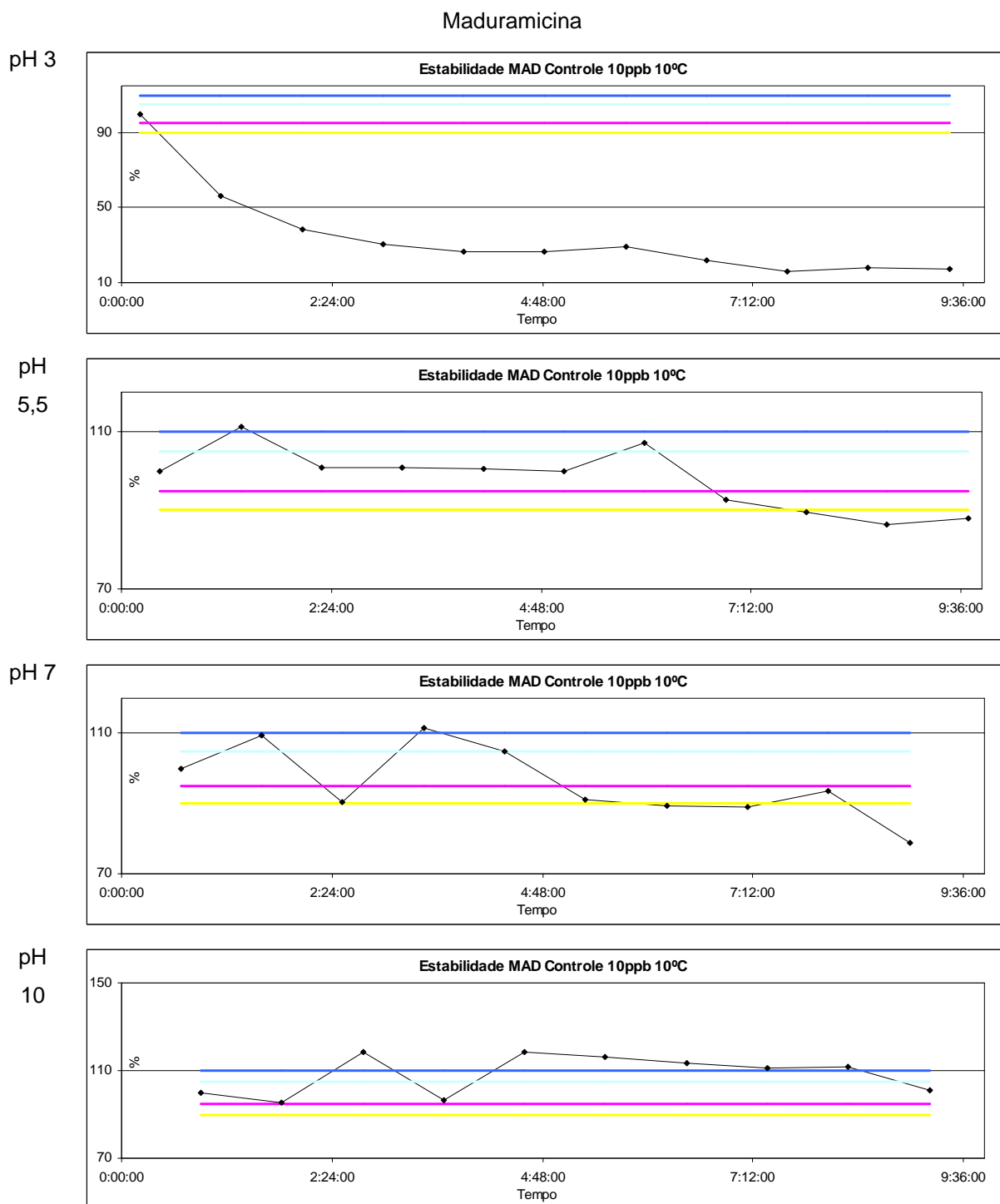


Figura 31. Perfil de estabilidade da MAD em diversos valores de pH.

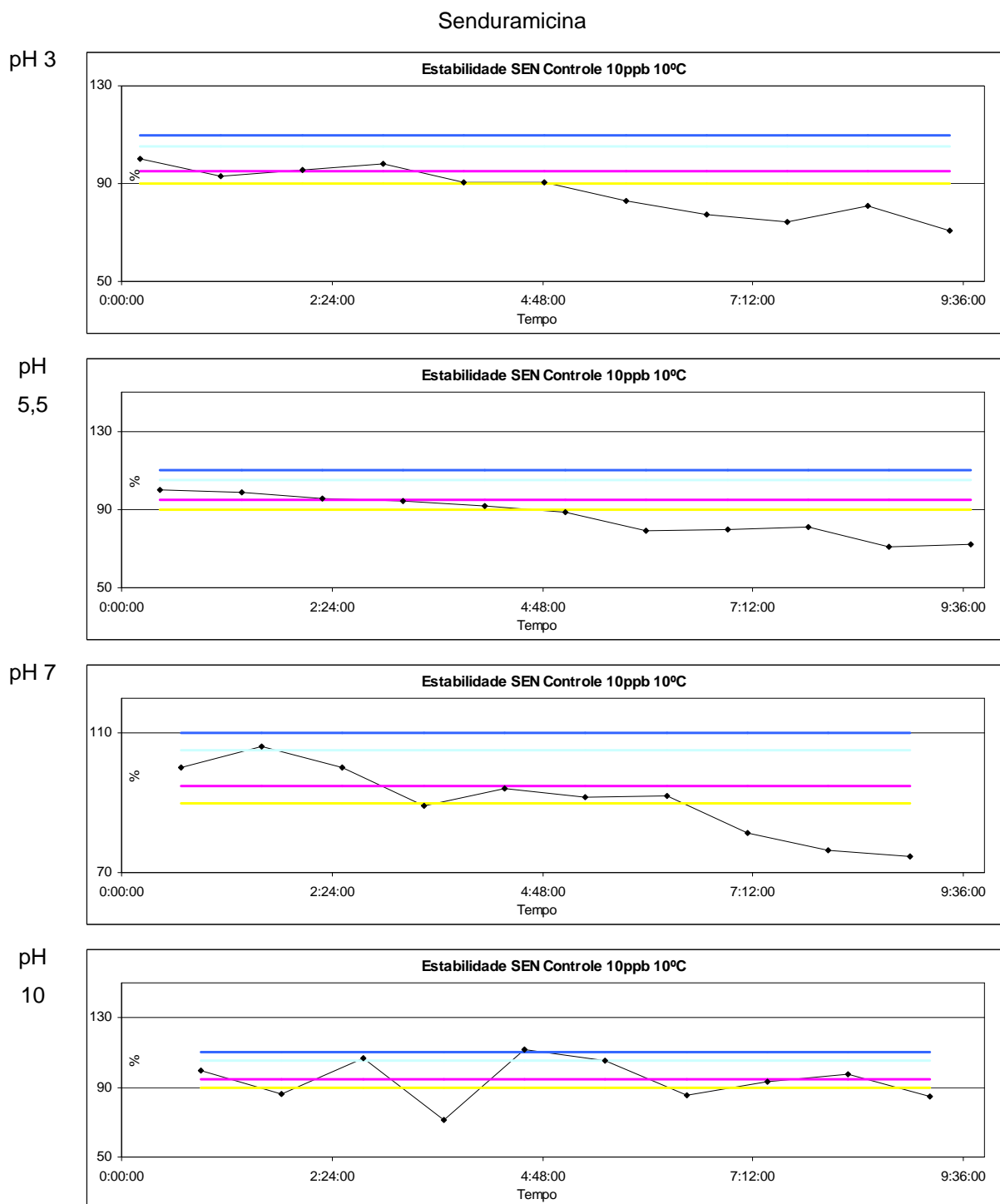


Figura 32. Perfil de estabilidade da SEN em diversos valores de pH.

4.2 Tetraciclinas

A validação foi realizada segundo a Decisão 657/2002 da UE (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Todos os resultados e discussões referentes ao desenvolvimento e validação do método para a determinação de tetraciclinas encontram-se descritos no manuscrito constante do Apêndice B (incluindo os dados complementares do artigo). Somente alguns resultados serão apresentados mais detalhadamente a seguir.

4.2.1 Seletividade

A seletividade do método em relação aos constituintes da matriz foi demonstrada em estudos de pré-validação pela análise de trinta e três amostras de leite, incluindo leite cru, leite UAT, leite pasteurizado e leite em pó. Não foram observadas diferenças entre os perfis obtidos para as amostras testadas. Um pico na transição m/z 461,2/355,0 característico da 4-EACTC pôde ser observado em todas as amostras na região de eluição da 4-EOTC, em $t_R \sim 11-12$ min, mas isso não comprometeu a seletividade do método, pois o t_R da 4-EACTC é muito superior ($t_R \sim 21$ min) e o pico só é detectável (razão sinal/ruído $\geq 3,0$) na transição de quantificação, não o sendo na transição de confirmação. Além de duas transições no mesmo tempo de retenção o critério da razão de íons foi adotado para confirmação da presença do analito. A Figura 33 apresenta os espectros de EM/EM das transições da OTC e 4-EOTC do leite empregado na validação do método (leite orgânico), onde se pode observar que as transições da OTC e da 4-EOTC não são detectadas, confirmando a caracterização de uma amostra isenta das substâncias a serem analisadas.

O método demonstrou ser adequado a leite cru, leite em pó, leite UAT e leite pasteurizado. Por praticidade e devido ao menor tempo de estocagem do leite pasteurizado na validação do método empregou-se para todos os demais experimentos o leite orgânico UAT.

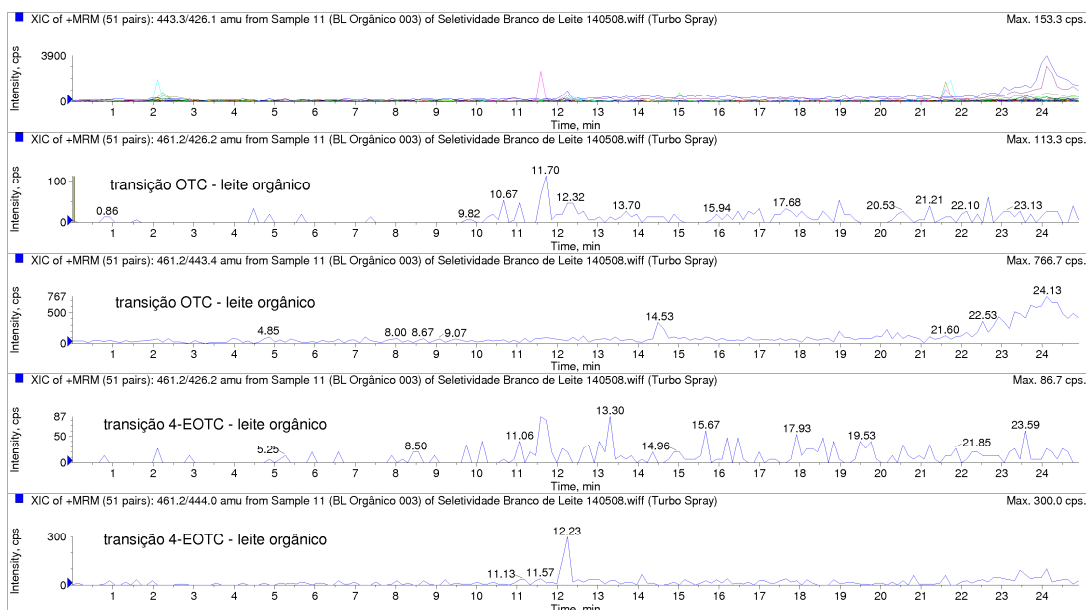


Figura 33. Espectros de EM/EM do leite empregado na validação do método (leite orgânico) apresentando as transições da OTC e 4-EOTC e comprovando tratar-se de amostra isenta das substâncias a serem analisadas.

4.2.2 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho (função de calibração)

A avaliação da faixa de trabalho e da faixa linear de trabalho foi efetuada pela construção de curvas de calibração para cada analito com sete níveis de concentração no diluente (ácido oxálico 10 mmol/L:metanol, 80:20, v/v). Essas concentrações (0,625 a 12,5 ng/mL) são equivalentes a 0,125 a 2,5 vezes o LMR para OTC, 4-EOTC, TC, 4-ETC, CTC e 4-ECTC. Para DC as concentrações (0,5 a 3,5 ng/mL) são equivalentes a 0,5 a 3,5 vezes o menor nível de validação (LVL) do método. Para MTC as concentrações (0,25 a 1,75 ng/mL) são equivalentes a 0,5 a 3,5 vezes o LVL. As soluções-padrão foram injetadas em triplicata aleatória. Somente picos com razão sinal/ruído ≥ 3 para a segunda transição (transição de confirmação) foram considerados detectados (exceto para CTC-ceto e 4-ECTC ceto, onde somente uma transição foi considerada).

As curvas foram preparadas em mais dois dias diferentes. O teste de *Levene* ($p \leq 0,05$) foi o empregado para as conclusões sobre a homogeneidade das variâncias dos dados das curvas analíticas.

A faixa de trabalho do equipamento CLAE-EM/EM demonstrou ser linear nos intervalos testados. Para todos os analitos, exceto a doxiciclina, o modelo linear foi obtido pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), com peso

equivalente a $1/x^2$, sendo x a concentração. O teste de *Lack of fit* indicou que os modelos ajustados pelo MMQP são adequados.

A Figura 34 apresenta como ilustração as três curvas plotadas em um mesmo gráfico para a 4-epiclortetraciclina efetuando-se a regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP). Visualmente são observadas diferenças entre as curvas entre os diversos dias. Assim, em função da maior variabilidade intrínseca do sistema de detecção é aconselhável efetuar a curva de calibração no dia, em conjunto com as amostras para análise.

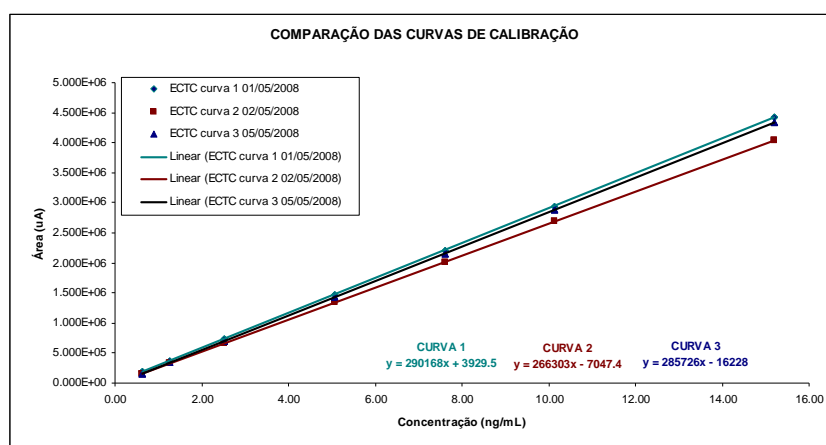


Figura 34. Gráfico das curvas de calibração efetuadas em três dias diferentes para a 4-epiclortetraciclina ajustadas pelo MMQP.

4.2.3 Linearidade e sensibilidade (incluindo efeito matriz)

Para as substâncias com limite permitido, as concentrações foram equivalentes a 0,5 a 3 vezes o LMR e para as demais substâncias (DC e MTC) as amostras foram fortificadas nos níveis de 1 a 3 vezes o menor nível de validação (LVL). Foram preparadas seis replicatas genuínas dos primeiros três níveis e duas replicatas genuínas dos dois níveis mais altos, além de duas replicatas genuínas de brancos de leite e um branco de reagentes. Uma série de soluções padrão no solvente de reconstituição ou diluente (ácido oxálico 10 mmol/L:metanol, 80:20, v/v) foi preparada nas mesmas concentrações.

A avaliação da linearidade e sensibilidade do método foi efetuada pela análise estatística das curvas de calibração de cada analito obtidas com a fortificação na matriz no início do procedimento (curva leite fortificado no início). Também se avaliou as curvas na matriz obtidas considerando-se a adição dos analitos após as etapas de extração, ou seja, com as amostras de leite fortificadas

no final do procedimento (curva leite fortificado no final). Nesse caso, a linearidade e sensibilidade verificadas são as do detector na presença da matriz e não a linearidade e sensibilidade do método. Para fins de comparação o mesmo foi feito com solução padrão (curva no diluente). Os testes estatísticos de *Levene* e *Lack of fit* ($p \leq 0,05$) indicaram que os modelos ajustados pelo MMQP foram mais adequados e que o método respondeu linearmente para todos os analitos nos intervalos de concentração estudados.

O parâmetro de validação sensibilidade é dado pelo coeficiente angular b_1 das curvas de calibração obtidas com a matriz fortificada no início. A sensibilidade do método foi maior para a DC e MTC.

A avaliação da significância do parâmetro b_0 , ou intercepto, dos modelos ajustados pelo MMQP indicou que o método não apresentou erros sistemáticos constantes ou absolutos (bias) devido à influência de interferências ou perdas significativas na recuperação independentemente do nível de concentração dos analitos.

O efeito matriz do método em relação aos fenômenos de supressão ou aumento de sinal na ionização considerando a técnica analítica empregada (CLAE-EM/EM) foi estudado comparando-se a curva de calibração de cada analito obtida com solução padrão (curva no diluente ou curva controle) com aquela obtida com a matriz, com a adição do analito após as etapas de extração/purificação, ou seja, com as amostras de leite fortificadas no final do procedimento (curva matriz final). Fenômenos de supressão ou aumento de sinal decorrentes da presença de substâncias outras que não os analitos de interesse não foram verificados.

A avaliação da eficiência do processo foi estudada comparando-se a curva de calibração de cada analito obtida com a matriz fortificada no início do procedimento (curva matriz início) com a curva de calibração obtida com a matriz fortificada após ter sido extraída/purificada, ou seja, com a matriz fortificada no final do procedimento (curva matriz final). Não foram verificados problemas significativos provenientes do processo de extração/purificação, exceto para os analitos 4-ETC e CTC e portanto, o método não apresentou erros sistemáticos proporcionais devido à interferentes ou perdas significativas na recuperação em função do nível de concentração dos analitos, exceto para esses dois analitos.

Dessas duas comparações de curvas concluiu-se que amostras reais devem ser quantificadas por interpolação em curvas de calibração obtidas com a matriz fortificada no início, com a vantagem de não ser necessário efetuar correções

de recuperação. A Figura 35 apresenta para ilustração o gráfico das curvas de calibração na matriz início, final e controle para a 4-epiclortetraciclina ajustadas pelo MMQP.

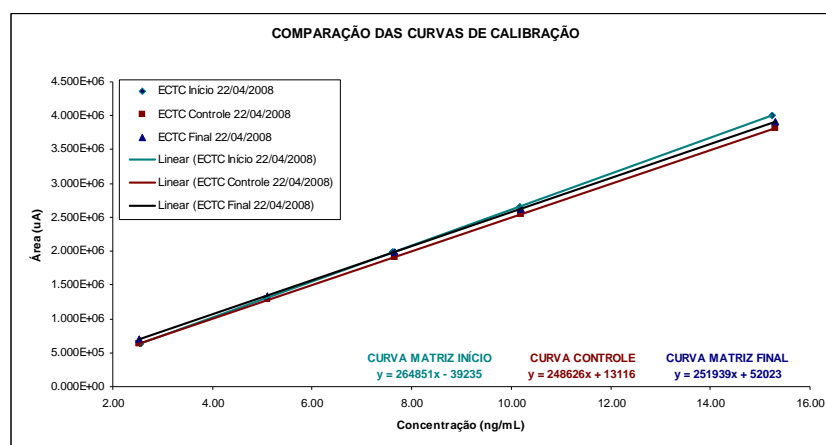


Figura 35. Gráfico das curvas de calibração na matriz início, final e controle para a 4-epiclortetraciclina ajustadas pelo MMQP.

4.2.4 Acurácia (exatidão e recuperação)

A exatidão do método (*trueness*) foi avaliada através de um material de referência certificado (MRC) do BCR[®] (*Bureau Communautaire de Reference*) fornecido pelo IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*) para a oxitetraciclina, composto de um material naturalmente contaminado (MRC 492) e um material branco (MRC 493). Os cálculos foram efetuados tanto conforme a orientação da Decisão 657/EC/2002 (EUROPEAN COMMISSION, 2002) quanto pelos procedimentos descritos na ISO Guia 33:2002 (Utilização de Materiais de Referência Certificados).

O resultado do cálculo de exatidão conforme descrito na Decisão 657/EC/2002 forneceu o valor de 87%, atendendo tanto as especificações do *Codex Alimentarius* e Mercosul quanto as da Comissão das Comunidades Europeias, demonstrando que o método é exato. A avaliação da exatidão pela ISO Guia 33 através da comparação da média \bar{x} com o valor certificado μ indicou que o método demonstrou ser tão exato (sem bias) quanto requerido.

A recuperação do método foi calculada para todos os experimentos de repetitividade e de precisão intermediária. As recuperações médias globais dos resultados em cada nível foram todas aceitáveis.

4.2.5 Precisão (repetitividade, precisão intermediária e análise de MRC)

Todos os resultados e discussão encontram-se bem detalhados no manuscrito e material suplementar (Apêndice B).

4.2.6 Robustez

A Tabela 17 mostra a matriz dos oito fatores avaliados no estudo da robustez do método: (1) o tempo de extração com o agitador mecânico (*shaker*); (2) a concentração do ácido oxálico na etapa de extração por fase sólida (EFS); (3) a concentração de ácido fórmico no metanol de eluição da EFS; (4) o tempo de repouso após a fortificação da matriz; (5) o tempo de centrifugação; (6) a temperatura de centrifugação; (7) a rotação de centrifugação e (8) a temperatura de evaporação no evaporador de nitrogênio. Os ensaios foram efetuados de forma aleatória e não conforme a ordem mostrada na tabela.

Os gráficos de Pareto (Figuras 36 e 37) indicaram, respectivamente, que efeitos significativos ($\alpha=0,05$) foram observados somente na temperatura de evaporação para o analito DMC e para a temperatura de centrifugação, além da temperatura de evaporação, para o analito DC.

Assim, o método foi robusto na faixa estudada a pequenas variações de quase todos os fatores estudados, exceto a temperatura de centrifugação (fator 6) e a temperatura de evaporação no evaporador de nitrogênio (fator 8), que são pontos críticos e devem ser controlados rigorosamente a 4°C (com variação inferior a $\pm 1^\circ\text{C}$) e 47°C (com variação máxima de $\pm 1^\circ\text{C}$), respectivamente.

Tabela 17. Matriz do planejamento composto central para avaliação da robustez do método.

Standard Run	Design: 2**(8-4) design (central composite tetracyclines)							
	Fator 1 (min)	Fator 2 (mmol/L)	Fator 3 (%)	Fator 4 (min)	Fator 5 (min)	Fator 6 (°C)	Fator 7 (rpm)	Fator 8 (+ -1°C)
1	18	18	3,5	14	4,0	3,0	4500	44
2	22	18	3,5	14	4,0	5,0	5500	50
3	18	22	3,5	14	6,0	3,0	5500	50
4	22	22	3,5	14	6,0	5,0	4500	44
5	18	18	4,5	14	6,0	5,0	5500	44
6	22	18	4,5	14	6,0	3,0	4500	50
7	18	22	4,5	14	4,0	5,0	4500	50
8	22	22	4,5	14	4,0	3,0	5500	44
9	18	18	3,5	16	6,0	5,0	4500	50
10	22	18	3,5	16	6,0	3,0	5500	44
11	18	22	3,5	16	4,0	5,0	5500	44
12	22	22	3,5	16	4,0	3,0	4500	50
13	18	18	4,5	16	4,0	3,0	5500	50
14	22	18	4,5	16	4,0	5,0	4500	44
15	18	22	4,5	16	6,0	3,0	4500	44
16	22	22	4,5	16	6,0	5,0	5500	50
17 (C)	20	20	4,0	15	5,0	4,0	5000	47
18 (C)	20	20	4,0	15	5,0	4,0	5000	47
19 (C)	20	20	4,0	15	5,0	4,0	5000	47
20 (C)	20	20	4,0	15	5,0	4,0	5000	47

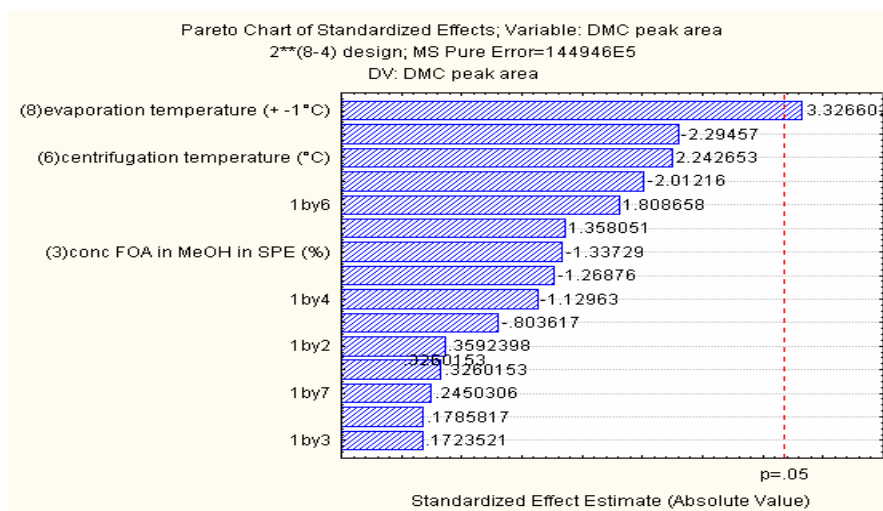


Figura 36. Gráfico de Pareto para o analito demeclociclina (DMC).

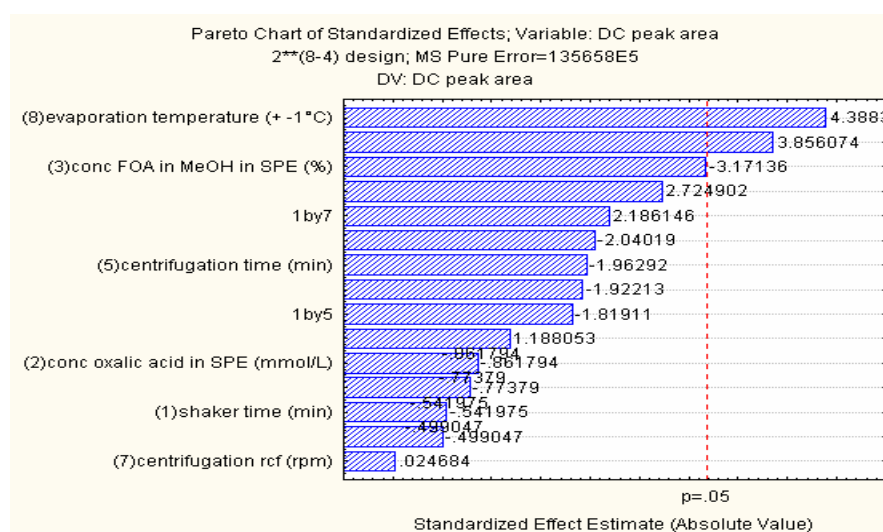


Figura 37. Gráfico de Pareto para o analito doxiciclina (DC).

4.2.7 Limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidades de detecção ($CC\beta$)

As concentrações críticas encontram-se detalhadas no artigo constante do Apêndice B.

4.2.8 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade também se encontram descritos no artigo constante do Apêndice B.

5 CONCLUSÕES

Conforme descrito no artigo constante do **Apêndice A**, o modelo atual existente para regular as relações produção-consumo de alimentos no Brasil baseia-se na divisão de atribuições entre os setores saúde e agricultura. Nos últimos anos vêm se observando um grande avanço no sentido de um trabalho conjunto e complementar entre os dois setores, além dos demais envolvidos na Segurança Alimentar, especialmente a referente a alimentos de origem animal. Os riscos de agravo à saúde decorrentes da exposição da população a resíduos de medicamentos veterinários ainda são pouco conhecidos. O Brasil ainda carece de dados sobre a ocorrência de resíduos em alimentos, e em função da problemática da resistência microbiana, os resíduos de antibióticos são de especial interesse aos órgãos de Vigilância Sanitária. Ainda não havia dados disponíveis sobre a incidência de resíduos de ionóforos polióteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos no Brasil. A maior parte das pesquisas efetuadas em leite pasteurizado no país empregou técnicas de triagem pouco específicas. A questão da formação dos 4-epímeros das tetraciclinas em leite também não havia sido suficientemente investigada.

O uso de metodologias analíticas adequadas é fundamental na obtenção de dados confiáveis. As duas metodologias analíticas desenvolvidas e validadas (**Apêndices B e C**) demonstraram ser aptas para o uso pretendido, respondendo assim aos dois primeiros objetivos do trabalho. A alta sensibilidade da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM) permitiu a detecção de ionóforos em ovos adquiridos na região metropolitana do Rio de Janeiro com uma frequência bastante elevada, de 25%. A salinomicina foi a substância encontrada na maioria dos casos (21%). Entretanto, o índice de resultados não-conformes foi de somente 2%, considerando a adoção da tolerância de 3 µg/kg vigente na União Européia e do limite de decisão (CC α) do método de 3,4 µg/kg para essa substância. Em uma das amostras a contaminação ultrapassou 17 vezes o valor aceitável. Em 8% das amostras analisadas mais do que um coccidiostático foi encontrado. A lincosamida lincomicina e o macrolídeo tilosina foram detectados em níveis de traços em 4 e 1% das amostras, respectivamente. Nenhum caso de contaminação por lasalocida, claritromicina e eritromicina foi verificado (**Apêndice D**). Embora a incidência de resíduos de ionóforos acima dos limites não tenha ultrapassado 2%, a avaliação da frequência de contaminação por marcas comerciais indica falhas no atendimento às

Boas Práticas Veterinárias por parte de alguns produtores. Esses resultados sugerem ainda que a contaminação cruzada das rações isentas de aditivos destinadas à avicultura de postura com rações medicadas seja a causa mais provável e que a salinomicina seja o coccidiostático mais usado no Brasil para aves de corte. Entretanto, investigações precisariam ser conduzidas para confirmar as hipóteses levantadas. Os objetivos 3 e 4 descritos na Seção 2 foram assim concluídos.

Quanto ao leite pasteurizado, a frequência de contaminação foi bem inferior, com apenas 14% das amostras apresentando traços de tetraciclina. Somente oxitetraciclina e tetraciclina foram detectadas e seus 4-epímeros não foram identificados. A concentração mais alta de oxitetraciclina encontrada nas amostras equivale a aproximadamente 1/9 o Limite Máximo de Resíduo de 100µg/kg adotado no Brasil (**Apêndice E**, atendendo ao objetivo 3). Esses resultados indicam que a população da região metropolitana do Rio de Janeiro não está exposta a níveis prejudiciais de tetraciclina pela ingestão de leite pasteurizado e que a oxitetraciclina é provavelmente a droga mais empregada em vacas lactantes na região.

Os dados obtidos serão utilizados futuramente na avaliação da exposição alimentar da população da região metropolitana do Rio de Janeiro a resíduos desses fármacos, contribuindo dessa forma para ações de Vigilância Sanitária capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde.

REFERÊNCIAS

ANADÓN, A.; MARTÍNE-LARRAÑAGA, M. R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livest. Prod. Sci*, v. 59, p. 183-198, 1999.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Estímulo às exportações de ovos. São Paulo, ed 1185, ano 101, n. 1, p. 10, 2010a.

_____. Segmento que cresce. São Paulo, ed 1186, ano 101, n. 2, p. 20-22, 2010b.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY. The MRL Standard: maximum residue limits in food and animal feedstuff. February 2010. Table 1. Maximum residue limits of agricultural and veterinary chemicals and associated substances in food commodities. Disponível em: <<http://www.apvma.gov.au/residues/standard.php>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 253, de 16 de setembro de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVet. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 15, de 26 de maio de 2009. 2009a. Regulamenta o registro dos estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 28 maio 2009.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. 2009b. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 10 jul. 2009.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 20 set. 2002.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização, constante dos anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 01 dez. 2004.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 8, de 29 de abril de 2010. 2010. Aprova os programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado para o exercício de 2010. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 3 maio 2010.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 5 de agosto de 2008. 2008a. Tornam públicos os resultados do monitoramento dos analitos incluídos aos programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, suína, aves e equina) e pescado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 7 agosto 2008.

_____. Portaria interministerial nº 902, de 22 de setembro de 2008. 2008b. Institui a Rede de Laboratórios de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal e vegetal destinados ao consumo direto e indireto. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 24 setembro 2008.

CODE of Federal Regulations. 21: Food and Drugs. Revised as of April 1, 2009. 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>>. Acesso em: 09 fev. 2010.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. ALINORM 08/31/31. Report of the 17th Session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods. 3-7 september 2007, Breckenridge, Colorado, USA. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=08>>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. ALINORM 09/32/31. Report of the 18th Session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods. May 2009. Appendix V. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?lang=en>>. Acesso em: 12 maio 2010.

_____. Codex Alimentarius: Veterinary Drug Residues in Food, Maximum Residue Limits, Chlortetracycline/Oxytetracycline/Tetracycline, Last Update 15 December 2006, Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.jsp>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. Procedural Manual. 19th ed. Rome: FAO/WHO, 2010. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp>. Acesso em: 15 abr 2010.

COMPÊNDIO de Produtos Veterinários. Sindan. Disponível em <http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html>. Acesso em: 08 fev. 2010.

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. *J. Chromatogr. B*, v. 813, p. 181-189, 2004.

DUBREIL-CHÉNEAU E. et al. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *J Chromatogr A*, v. 1216, p. 8149-8157, 2009.

ELLIOTT, C. T.; KENNEDY, D. G.; MCCAUGHEY, W. J. Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. *Critical Review. Analyst*, v. 123, p. 45R-56R, 1998.

EMBRAPA Gado de Leite. Laboratórios de qualidade do leite terão R\$ 12 milhões para modernizar sua infra-estrutura. Convênio entre MAPA e EMBRAPA consolida a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite. 01 dez. 2008. 2008a. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=413>>. Acesso em: 2 dez. 2008.

_____. Leite: sobe a produção e cai o número de produtores. 12 fev. 2008. 2008b. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=374>>. Acesso em: 2 dez. 2008.

_____. Ministério da Agricultura estuda mudanças na Rede de Laboratórios de Qualidade do Leite. Rede de Laboratórios pode ampliar suas funções e executar um programa nacional de análise de rebanhos leiteiros. 20 out. 2008. 2008c. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=410>>. Acesso em: 2 dez. 2008.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC, of 14 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Communities*, Brussels, n. L. 221, p. 8-36, 17 Aug. 2002.

_____. Commission Regulation (EU) No 37/2010, of 22 December 2009. On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Union*, Brussels, n. L. 15, p. 1-72, 20 Jan. 2010.

_____. Commission Regulation (EU) No 1831/2003, of 22 September 2003. On additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union*, Brussels, n. L. 268, p. 29-43, 18 Oct. 2003.

_____. Regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Off J Eur Comm*. L40, p. 7-11, 2009a.

_____. Regulation (EC) No 470/2009, of 6 May 2009. Laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. 2009b. *Off. J. Eur. Union*, Strasbourg, n. L. 152, p. 11-22, 16 June 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the Commission on the evaluation of coccidiostat Kokcisan® 120G (Question N° EFSA-2003-050). Adopted on 7 May 2004. *The EFSA Journal*, v. 63, p. 1-41, 2004a. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/466.html>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the Commission on the re-evaluation of coccidiostat Sacox® 120 microGranulate in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC (Question N° EFSA-2003-047). Adopted on 30 June 2004. *The EFSA Journal*, v. 76, p. 1-49, 2004b. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/509.html>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the Commission on the re-evaluation of efficacy and safety of the coccidiostat Monteban® G100 in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC (Question N° EFSA-2003-046). Adopted on 27 July 2004. *The EFSA Journal*, v. 90, p. 1-44, 2004c. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/518.html>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the Commission on the safety and the efficacy of product “Bio-Cox 120G” as feed additive in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Question N° EFSA-2003-009). Adopted on 1 July 2004. *The EFSA Journal*, v. 75, p. 1-51, 2004d. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/511.html>. Acesso em: 3 dez. 2004.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the European Commission on the evaluation of the coccidiostat COXIDIN® (Monensin Sodium) (EFSA- 2005-024). Adopted on 20 Oct. 2005. *The EFSA Journal*, v. 283, p. 1-53, 2005. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/1220.html>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the reevaluation of coccidiostat Avatec in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC (EFSA-Q-2003-042). Adopted on 15 April 2004. *The EFSA Journal*, v. 53, p. 1-44, 2004e. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/423.html>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the request of the Commission on the reevaluation of coccidiostat Elancoban in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC (EFSA-Q-2003-0045). Adopted on 4 March 2004. *The EFSA Journal*, v. 42, p. 1-61, 2004f. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/288.html>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the safety of Coxidin® (monensin sodium) (EFSA-Q-2006-005). Adopted on 12 July 2006. *The EFSA Journal*, v. 381, p. 1-10, 2006a. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/feedap_op_ej381_coxidin.html>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. Update of an opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the reevaluation of coccidiostat Avatec in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC (EFSA-Q-2004-076). Adopted on 1 July 2004. *The EFSA Journal*, v. 77, p. 1-45, 2004g. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/504.html>. Acesso em: 5 dez. 2008.

_____. Update of the opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on a request from the European Commission related to the safety and efficacy of “Kokcisan 120G” (EFSA-Q-2006-006). Adopted on 11 July 2006. *The EFSA Journal*, v. 378, p. 1-12, 2006b. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinions/feedap_op_ej378_kokcisan.html>. Acesso em: 5 dez. 2008.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. Lasalocid (Extension to eggs) (EMEA/CVMP/201708/2007-Final-corr¹). Summary Report, May 2007. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu>>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Doxycycline Hiclate. Summary Report (1), EMEA/MRL/101/96-FINAL. June 1996. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/htms/vet/mrls/a-zmrl.htm>>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Erythromycin (Extension to all food producing species). EMEA/MRL/821/02-FINAL Jan 2002a. Summary Report (3). Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/082102en.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Lasalocid Sodium (EMEA/MRL/912/04-FINAL). Summary Report, October 2004. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int>>. Acesso em: 3 out. 2005.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Lincomycin (EMEA/MRL/497/98-FINAL-corr 1). Summary Report (1), September 1998a. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/049798en.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Note for Guidance on the Risk Analysis Approach for Residues of Veterinary Medicinal Products in Food of Animal Origin (EMA/CVMP/187/00-FINAL). 10 Apr 2001. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/index/indexv1.htm>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline. Summary Report (3), EMA/MRL/023/95. 1995. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/htms/vet/mrls/a-zmrl.htm>>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Pirlimycin. EMA/MRL/460/98-FINAL July 1998b. Summary Report (1). Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/046098en.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Spiramycin. [entre 1995 e 1999]. Summary Report (2). Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Spiramycin2.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Tilmicosin (Extension to chicken). EMA/MRL/318/97-FINAL Nov 1997a. Summary Report (1). Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/031897en.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Tulathromycin. EMA/MRL/842/02-FINAL June 2002b. Summary Report (1). Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/084202en.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

_____. Committee for Veterinary Medicinal Products. Tylosin. EMA/MRL/205/97-FINAL April 1997b. Summary Report (3). Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/020597en.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Food Outlook. November 2008. Global Market Analysis. Milk and milk products. 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>>. Acesso em: 15 abril 2010.

_____. FAOSTAT. FAO Statistical Yearbook 2009. Agricultural Production. Production of milk and eggs (Table B12). 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/publications-studies/statistical-yearbook/fao-statistical-yearbook-2009/en/>>. Acesso em: 15 abril 2010

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Procedures for Recommending Maximum Residue Limits – Residues of Veterinary Drugs in Food (1987-1999). Rome, 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_guidelines_1_en.asp>. Acesso em: 15 abril 2010.

_____. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-sixth meeting (Residues of veterinary drugs). 2006 Feb 22-28; Rome; Italy. Summary and Conclusions. Rome, March 2006a.

_____. Updating the Principles and Methods of Risk Assessment: MRLs for Pesticides and Veterinary Drugs. Report of a Joint FAO/RIVM/WHO Workshop; 2005 Nov 7-10; Bilthoven; The Netherlands. Rome, 2006b. http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_new_en.asp

HEALTH CANADA. Veterinary Drugs Directorate. Administrative Maximum Residue Limits (AMRLS) and Maximum Residue Limits (MRLS) set by Canada. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.php>. Acesso em: 10 fev. 2010.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. Produção da Pecuária Municipal 2007, v. 35, p. 1-62, 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 3 fev. 2010.

_____. Indicadores. Estatística da Produção Pecuária. Março de 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 23 maio 2010.

JESTOI, M.; ROKKA, M.; PELTONEN, K. An integrated sample preparation to determine coccidiostats and emerging Fusarium-mycotoxins in various poultry tissues with LC-MS/MS. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 51, p. 625-637, 2007.

KOUYOUMDJIAN, J. A. et al. Fatal rhabdomyolysis after acute sodium monensin (Rumensin®) toxicity. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 59 (3-A), p. 596-598, 2001.

LEITE, J. L. B. et al. (Ed.). *O Comércio Internacional de Lácteos*. Juiz de Fora: Templo, 2008. 281p.

LINDSEY, D. S.; BLAGBURN, B. L. Antiprotozoan drugs. In: VETERINARY Pharmacology and Therapeutics. Iowa: Adams, H. R. (Ed.), 1995. 1181p., Chap. 47, p. 955-983.

MATABUDUL, D. K.; LUMLEY, I. D.; POINTS, J. S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin, and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst*, v. 127, n. 6, p. 760-768, 2002.

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

NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 3, p. 191-197, 2009.

OFFICE OF CHEMICAL SAFETY. Australian Government. Department of Health and Ageing. ADI List: Acceptable Daily Intakes for Agricultural and Veterinary Chemicals, 31 December 2008. Disponível em: <<http://www.nhhrc.org.au/internet/main/publishing.nsf/Content/ocs-adi-list.htm>>. Acesso em: 9 fev. 2010.

QUEVEDO, A. Preços baixos. *Anuário 2010 da Avicultura Industrial*, n. 11, ano 101, ed.1184, p. 61-64, 2009.

RAJESWARAN, M.; SRIKRISHNAN, T. Crystal and molecular structure and absolute configuration of lincomycin hydrochloride monohydrate. *Carbohydr. Res.*, v. 339, p. 2111–2115, 2004.

RAMI, S. Desafios para incrementar o consumo de ovos: a visão da indústria de processamento. *Anuário 2010 da Avicultura Industrial*, n. 11, ano 101, ed. 1184, p. 98-100, 2009.

ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. *Food Addit. Contam.*, v. 23, n. 5, p. 470-478, 2006.

SANTOS FILHO, J. I. et al. Perspectivas para o consumo de ovos no Brasil. *Avicultura Industrial*, São Paulo, ed. 1186, ano 101, n. 2, p. 14-18, 2010.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION (SCAN). Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Lasalocid Sodium in Feedstuffs for Chickens. Opinion expressed 14 December 1982. 1982a. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/17_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Maduramicin Ammonium in Feedstuffs for Chickens for Fattening. Opinion expressed 27 April 1988. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/24_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Monensin Sodium in Feedstuffs for Poultry. Opinion expressed 11 March and 9 December 1981. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/26_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Narasin in Feedstuffs for Chickens. Opinion expressed 14 April 1982. 1982b. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/30_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Salinomycin in Feedstuffs. Opinion expressed 14 April 1982. 1982c. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/43_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Use of Semduramicin Sodium in Feedstuffs for Chickens for Fattening. Adopted on 17 April 2002. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out80_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Second Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Monensin Sodium in Feedstuffs for Turkeys. Opinion expressed 23 November 1983. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/27_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Second Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Narasin in Feedstuffs for Chickens. Opinion expressed 8 February 1984. 1984a. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/29_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

_____. Second Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the Use of Salinomycin in Feedstuffs for Chickens. Opinion expressed 4 April 1984. 1984b. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm6/antibiotics/44_en.pdf>. Acesso em: 3 dez. 2008.

SHARMA, N. et al. Toxicity of maduramicin. *Emerg Med J*, v. 22, p.880-882, 2005.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da Vigilância Sanitária e demais sistemas regulatórios. *Rev C S Col*, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

SPOO, J. W.; RIVIERE J. E. Chloramphenicol, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones, and miscellaneous antibiotics. In: VETERINARY Pharmacology and Therapeutics. Iowa: Adams, H. R. (Ed.), 1995. 1181p., Chap. 43, p. 820-854.

THE MERCK VETERINARY MANUAL. Merck & Co., Inc, 2008. Disponível em: <<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp>>. Acesso em: 08 fev. 2010.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. Clarithromycin Material Safety Data Sheet. 2005.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. Relatório Anual 2009. 2010. Disponível em: <<http://www.uba.org.br>>. Acesso em: 28 maio 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Foreign Agricultural Service. Office of Global Analysis. Dairy: world markets and trade. Circular Archives, December 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2010.

WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 954, 2009.

_____. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Sixty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 939, 2006.

_____. Evaluation of certain veterinary drug residues. Fiftieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 888, 1999.

_____. Evaluation of certain veterinary drug residues. Fifty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 911, 2002.

_____. Evaluation of certain veterinary drug residues. Forty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 879, 1998.

_____. Evaluation of certain veterinary drug residues. Sixty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 925, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. Report of the Second WHO Expert Meeting; 29–31 May 2007; Copenhagen. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf> Acesso em: 11 maio 2010.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE list of antimicrobials of veterinary importance. 2007. Disponível em: <http://www.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf> Acesso em: 11 maio 2010.

YOUNG R.; NUNAN C. Too hard to crack? Eggs with drug residues. Report four of the series The use and misuse of antibiotics in UK agriculture. Bristol: Soil Association, 2004. 72 p. Disponível em: <<http://www.soilassociation.org>>. Acesso em: 21 dez. 2009.

APÊNDICE A

Artigo científico 1

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e Contaminantes Químicos em Alimentos de Origem Animal no Brasil: Histórico, Legislação e Atuação da Vigilância Sanitária e Demais Sistemas Regulatórios. *Rev. C. S. Col.*, v. 14, n. 6, p. 2091-2106, 2009.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1413-81232009000600016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

APÊNDICE B

Artigo científico 2

SPISSO, B. F.; ARAÚJO JR, M. A. G.; MONTEIRO, M. A.; LIMA, A. M. B.; PEREIRA, M. U.; LUIZ, R. A.; NÓBREGA, A. W. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Anal. Chim. Acta*, v. 656, n.1-2, p. 72-84, 2009.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TF4-4XGBG1Y-5-V&_cdi=5216&_user=685730&_pii=S0003267009013890&_origin=search&_coverDate=12%2F10%2F2009&_sk=993439998&_view=c&_wchp=dGLbVlb-zSkzS&_md5=63bacfda8a0a6b77cdc1767111806f5b&_ie=/sdarticle.pdf

APÊNDICE C

Artigo científico 3

SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. A.; COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; NÓBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Anal. Chim. Acta*, v. 682, n. 1-2, p. 82-92, 2010 (submetido em maio de 2010).

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TF4-5161PDN-2-C&_cdi=5216&_user=685730&_pii=S0003267010012298&_origin=search&_coverDate=12%2F03%2F2010&_sk=993179998&_view=c&_wchp=dGLzVtb-zSkWA&_md5=71a0d0a5ba79fac931ed812effa3c774&_ie=/sdarticle.pdf

APÊNDICE D

Artigo científico 4

SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. *Food Addit. Contam. B*, v. 3, n. 4, p. 212-219, 2010 (submetido em maio de 2010).

<http://www.informaworld.com/smpp/ftinterface~content=a930167042~fulltext=713240930~frm=content>

APÊNDICE E

Artigo científico 5

SPISSO, B. F.; MONTEIRO, M. A.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of commercial pasteurized milk consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for tetracyclines residues, including the 4-epimers of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline. *Food Addit. Contam. B*, v. 3, n. 4, p. 220-227, 2010 (submetido em maio de 2010).

<http://www.informaworld.com/smpp/ftinterface~content=a930152060~fulltext=713240930~frm=content>