

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Veterinária  
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Rafael Silva Gomes

**Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos, por HPLC/MS-MS, em rim  
de frangos de corte submetidos a tratamento farmacológico**

Belo Horizonte  
2019

Rafael Silva Gomes

**Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos, por HPLC/MS-MS, em rim de frangos de corte submetidos a tratamento farmacológico**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Vasconcelos Cançado

Belo Horizonte  
2019

G633a Gomes, Rafael Silva, 1978

Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos por HPLC/MS-MS, em rim de frango de corte submetidos a tratamento farmacológico/ Rafael Silva Gomes - 2019  
52p.: il.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Silvana de Vasconcelos Cançado

Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

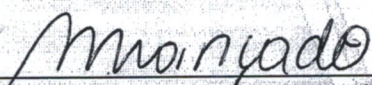
1.Frango de corte – Doenças -Teses. - 2. Frango de corte – Efeito das drogas - Teses. - 3.antimicrobiano- Teses. – 4. Rins – Teses. –5 - Medicamentos – Teses. I. Cançado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

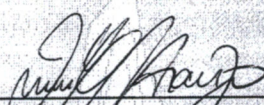
CDD 636.513.089

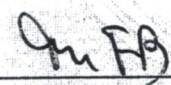
**FOLHA DE APROVAÇÃO****RAFAEL SILVA GOMES**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 06 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Silvana de Vasconcelos Cançado  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Italo Conrado Sousa de Araujo  
Escola de Veterinária - UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Thiago Freitas Borgati  
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, pelo apoio.

À professora Silvana, pela parceria, ensinamentos, paciência e compreensão.

Aos demais professores do DTIPOA, especialmente à Professora Débora, que me inspiraram e auxiliaram na minha formação.

Ao Nélcio Fleury e demais funcionários do LANAGRO-GO, pela receptividade e presteza, fundamentais na condução deste experimento.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela formação profissional.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, pelo apoio e incentivo.

Sobretudo a Deus, fonte inesgotável de força, equilíbrio e perseverança durante o caminho.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a presença e os níveis de resíduos de cinco antimicrobianos em rim de frangos de corte, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS). Foram utilizados 240 frangos de corte da linhagem Cobb alojados em doze boxes experimentais contendo 20 aves cada. Os tratamentos, definidos de acordo com o antimicrobiano fornecido às aves foram os seguintes: A) aves que não receberam medicamento (controle); B) aves que receberam tilosina via ração; C) aves que receberam lincomicina via ração; D) aves que receberam enrofloxacin na água de beber; E) aves que receberam sulfaquinoxalina na água de beber e; F) aves que receberam oxitetraciclina na água de beber. Os medicamentos do tratamento B e C foram fornecidos aos animais do primeiro dia até o 35º dia de criação enquanto os medicamentos dos tratamentos D, E e F foram fornecidos nos dias 32, 33 e 34 de criação. As aves dos grupos A, B e C foram abatidas nos dias 35, 36, 38, 40, enquanto as aves do grupo D, E e F foram abatidas nos dias 33, 34, 35, 36, 38 e 40 para coleta de rim para avaliação da presença de resíduos dos antimicrobianos utilizados. Os resultados das análises das amostras de rim dos frangos de corte para os analitos tilosina e lincomicina demonstraram que não foi detectada a presença de resíduos desses antimicrobianos, pois, todos os sinais estiveram abaixo do limite de detecção (LD) do método utilizado, para todos os dias de abate dos animais. Os resultados das análises das amostras de rim dos frangos de corte para os analitos enrofloxacin, sulfaquinoxalina demonstraram a presença de resíduos desses antimicrobianos, em concentrações acima dos limites máximos de resíduos (LMR) de cada droga, até o 36º dia (dois dias após o término do tratamento) e 37º dia (três dias após o término do tratamento) de criação das aves, respectivamente. Para a pesquisa de resíduos de oxitetraciclina foram observados resultados acima do LMR apenas no 34º dia de criação (último dia de tratamento). Também foi observado que após cinco dias da retirada dos medicamentos, para todos os medicamentos avaliados, as concentrações de resíduos encontradas foram inferiores ao limite de quantificação (LQ) do método. Foi concluído que o todos os antimicrobianos utilizados são rapidamente metabolizados pelo organismo dos frangos de corte pois, cinco dias após o final dos tratamentos não foram mais detectados resíduos das drogas avaliadas.

**Palavras-chave:** antimicrobianos; HPLC/MS-MS; resíduos; rim de frango de corte

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the presence and residue levels of five antimicrobials in the kidneys of broilers using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC/MS-MS). A total of 240 Cobb broilers were housed in twelve experimental pens containing 20 birds each. The treatments, defined according to the antimicrobial administered to the birds, were as follows: A) birds that received no medication (control); B) birds that received tylosin in the feed; C) birds that received lincomycin in the feed; D) birds that received enrofloxacin in the drinking water; E) birds that received sulfaquinoxaline in the drinking water; and F) birds that received oxytetracycline in the drinking water. The medications from treatments B and C were administered to the animals from day 1 to day 35 of rearing, while the medications from treatments D, E, and F were administered on days 32, 33, and 34 of rearing. The birds in groups A, B, and C were slaughtered on days 35, 36, 38, and 40, while the birds in groups D, E, and F were slaughtered on days 33, 34, 35, 36, 38, and 40 for kidney collection to evaluate the presence of residues of the antimicrobials used. The results of the analysis of the kidney samples from the broilers for the analytes tylosin and lincomycin demonstrated that the presence of residues of these antimicrobials was not detected, since all the signals were below the detection limit (LD) of the method used, for all the days of slaughter of the animals. The results of the analysis of kidney samples from broilers for the analytes enrofloxacin and sulfaquinoxaline demonstrated the presence of residues of these antimicrobials, at concentrations above the maximum residue limits (MRLs) for each drug, up to day 36 (two days after the end of treatment) and day 37 (three days after the end of treatment), respectively. For the test of oxytetracycline residues, results above the MRL were observed only on day 34 of rearing (the last day of treatment). It was also observed that five days after drug withdrawal, residue concentrations for all drugs evaluated were below the limit of quantification (LQ) of the method. It was concluded that all antimicrobials used are rapidly metabolized by the bodies of broilers, since five days after the end of treatment, no more residues of the drugs evaluated were detected.

**Key words:** antimicrobials; HPLC/MS-MS; wastes, broiler chicken kidney

---

## LISTA DE FIGURAS

---

|           |                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Estrutura base dos macrolídeos.....                                                                                                                                                                                                    | 20 |
| Figura 2  | Estrutura da lincomicina.....                                                                                                                                                                                                          | 21 |
| Figura 3  | Estrutura base das quinolonas.....                                                                                                                                                                                                     | 23 |
| Figura 4  | Estrutura base das sulfonamidas.....                                                                                                                                                                                                   | 24 |
| Figura 5  | Estrutura base das tetraciclínas.....                                                                                                                                                                                                  | 26 |
| Figura 6  | Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência: a) Reservatório da fase móvel; b) Bomba; c) Válvula de injeção da amostra; d) Coluna cromatográfica; e) Detector e f) Registrado.                      | 34 |
| Figura 7  | Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....                                                                                                                                                                                 | 35 |
| Figura 8  | Fluxograma de procedimentos de extração.....                                                                                                                                                                                           | 45 |
| Figura 9  | Curvas de regressão dos antimicrobianos tilosina (A), lincomicina (B), enrofloxacina (C), sulfaquinoxalina (D) e oxitetraciclina (E), adicionados às amostras de rim de frango, na faixa de 5 a 200 µg/Kg.....                         | 49 |
| Figura 10 | Cromatogramas dos analitos (padrões) tilosina (A), lincomicina (B), enrofloxacina (C), sulfaquinoxalina (D) e oxitetraciclina (E) recuperados no controle positivo 100% x LMR (CC 100) e do padrão interno.....                        | 50 |
| Figura 11 | Cromatogramas da pesquisa de resíduos dos antimicrobianos tilosina (A), lincomicina (B), enrofloxacina (C), ciprofloxacina (D), sulfaquinoxalina (E) e oxitetraciclina (F) em amostra de rim de frango de corte do grupo controle..... | 52 |
| Figura 12 | Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com tilosina na ração de consumo, coletada no 35º dia de criação .....                                                                                          | 53 |
| Figura 13 | Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com lincomicina na ração de consumo, coletada no 35º dia de criação .....                                                                                       | 53 |
| Figura 14 | Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com enrofloxacina na água de beber, coletada no 33º dia de criação .....                                                                                        | 55 |
| Figura 15 | Concentrações medianas de resíduos do antimicrobiano enrofluxacina analisado pelo método de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual.....                                 | 56 |
| Figura 16 | Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com sulfaquinoxalina na água de beber, coletada no 33º dia de criação.....                                                                                      | 59 |

---

---

|           |                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 17 | Concentrações medianas de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisado pelo método de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual..... | 59 |
| Figura 18 | Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com oxitetraciclina na água de beber, coletada no 33º dia de criação.....                                                          | 61 |
| Figura 19 | Concentrações medianas de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisado pelo método de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual.....  | 62 |

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

|          |                                                                                                                                                                                                                       |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Alguns antimicrobianos utilizados em aves.....                                                                                                                                                                        | 19 |
| Tabela 2 | Fortificação de amostras branca para curva de calibração com o volume de solução de adição.....                                                                                                                       | 44 |
| Tabela 3 | Programação de gradiente da fase móvel Tetraciclinas + Macrolídeos + Lincosamidas (API 5000).....                                                                                                                     | 46 |
| Tabela 4 | Parâmetros de operação do espectrômetro de massas API 5000.....                                                                                                                                                       | 47 |
| Tabela 5 | Transições MRM e tempo de retenção dos analitos pesquisados.....                                                                                                                                                      | 47 |
| Tabela 6 | Mediana, máximos e mínimos das concentrações de resíduos do antimicrobiano enrofloxacin analisado por HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual.....    | 55 |
| Tabela 7 | Mediana, máximos e mínimos das concentrações de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisados por HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual..... | 58 |
| Tabela 8 | Mediana, máximos e mínimos das concentrações de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados por HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual.....  | 61 |

---

## LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização química a pressão atmosférica

APPI – Fotoionização a pressão atmosférica

CAD – Gas de Colisão

Cc – Corrente contínua

CC – Concentração Controle

CCAB – Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil

CE – Energia de Colisão

CEUA – Comissão de Ética no USO de Animais

CG – Cromatografia Gasosa

CN – Controle Negativo

CONMETRO – Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CUR – Gás de Solvatação

CVMP – *Committee for Veterinary Medicinal Products*

CXP – Célula de Colisão

DP – Potencial de Desagregação

DRC – Doença Respiratória Crônica

DTIPOA – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

EC – Eletroforese Capilar

EFC – Extração em fase sólida

EMEA – Agência Europeia de Medicina

EP – Potencial de Entrada

ESI – Electrospray

EV-UFMG – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

FDA – *Food and Drug Administration*.

FEPHB – Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa

GD2 – Gás Secante Aquecido

GS1 – Gás Nebulizante

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High performance liquid chromatography*)

HPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial

IDA – Ingestão Diária Aceitável

LANAGRO/GO – Laboratório Nacional Agropecuário de Goiás

LC-IT-TOF – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas, analisador do tipo *tandem ion-trap-time of flight*

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

LD – Limite de Detecção

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LQ – Limite de Quantificação

LRC – Laboratório de Resíduos e Contaminantes

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MCTIC – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

MRM – *Multiple Reaction Monitoring*

MS/MS – Espectrometria de Massas Sequencial

OIE – Organização Mundial da Sanidade Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PABA – Ácido p-aminobenzoico

PI – Padrão Interno

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

*Pool* – Solução Padrão de Adição

Rf – Radiofrequência

ToF – *Time of flight*

UPLC/MS-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas

---

## SUMÁRIO

---

|          |                                                                                                  |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                           | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                            | <b>16</b> |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                | <b>16</b> |
| 3.1      | Agentes antimicrobianos.....                                                                     | 16        |
| 3.2      | Antimicrobianos na avicultura.....                                                               | 18        |
| 3.3      | Macrolídeos.....                                                                                 | 19        |
| 3.3.1    | Propriedades químicas e mecanismo de ação.....                                                   | 20        |
| 3.3.2    | Farmacocinética e período de carência .....                                                      | 20        |
| 3.3.3    | Indicação de uso.....                                                                            | 21        |
| 3.4.     | Lincosamidas.....                                                                                | 21        |
| 3.4.1    | Propriedades químicas e mecanismo de ação.....                                                   | 22        |
| 3.4.2    | Farmacocinética e período de carência .....                                                      | 22        |
| 3.4.3    | Indicação de uso.....                                                                            | 22        |
| 3.5      | Quinolonas.....                                                                                  | 22        |
| 3.5.1    | Propriedades químicas e mecanismo de ação.....                                                   | 23        |
| 3.5.2    | Farmacocinética e período de carência .....                                                      | 23        |
| 3.5.3    | Indicação de uso.....                                                                            | 23        |
| 3.6      | Sulfonamidas.....                                                                                | 24        |
| 3.6.1    | Propriedades químicas e mecanismo de ação.....                                                   | 25        |
| 3.6.2    | Farmacocinética e período de carência .....                                                      | 25        |
| 3.6.3    | Indicação de uso.....                                                                            | 25        |
| 3.7      | Tetraciclínas.....                                                                               | 26        |
| 3.7.1    | Propriedades químicas e mecanismo de ação.....                                                   | 26        |
| 3.7.2    | Farmacocinética e período de carência .....                                                      | 27        |
| 3.7.3    | Indicação de uso.....                                                                            | 27        |
| 3.8      | Resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal.....                                    | 27        |
| 3.9      | Regulamentação sobre a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal..... | 29        |
| 3.10     | Métodos analíticos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos.....                             | 31        |
| 3.10.1   | Métodos físico-químicos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos.....                        | 32        |
| 3.10.1.1 | Técnica de extração em fase sólida ( <i>EFS</i> ) para análise de resíduos.....                  | 32        |
| 3.10.1.2 | Cromatografia líquida de alta aficiência (HPLC).....                                             | 33        |

---

|            |                                                                         |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.10.1.3   | Espectrometria de massas.....                                           | 35        |
| 3.10.1.3.1 | Fontes de ionização por electrospry (ESI).....                          | 36        |
| 3.10.1.3.2 | Analísadores de massa.....                                              | 36        |
| 3.10.1.4   | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS).....  | 37        |
| 3.11       | Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em frangos de corte.....        | 37        |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                          | <b>39</b> |
| 4.1        | Criação dos animais.....                                                | 40        |
| 4.2        | Tratamentos.....                                                        | 40        |
| 4.3        | Obtenção das amostras.....                                              | 41        |
| 4.4        | Análise dos resíduos de antimicrobianos.....                            | 41        |
| 4.4.1      | Equipamentos.....                                                       | 41        |
| 4.4.2      | Insumos.....                                                            | 42        |
| 4.4.3      | Reagentes e padrões.....                                                | 42        |
| 4.4.3.1    | Preparo das soluções.....                                               | 43        |
| 4.4.3.1.1  | Solução estoque.....                                                    | 43        |
| 4.4.3.1.2  | Solução padrão de adição ( <i>Pool</i> ) .....                          | 43        |
| 4.4.3.1.3  | Solução padrão de calibração <i>Pool</i> para HPLC-MS/MS.....           | 43        |
| 4.4.3.1.4  | Solução de padrão interno (PI) (Enrofloxacino-D5).....                  | 44        |
| 4.4.3.1.5  | Soluções reagentes.....                                                 | 44        |
| 4.4.4      | Extração das amostras.....                                              | 45        |
| 4.4.5      | Parâmetros instrumentais.....                                           | 46        |
| 4.4.6      | Análise dos dados obtidos.....                                          | 48        |
| 4.5        | Delineamento experimental.....                                          | 48        |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                      | <b>48</b> |
| 5.1        | Curvas de calibração dos antimicrobianos utilizados.....                | 48        |
| 5.2        | Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em rim de frangos de corte..... | 51        |
| 5.2.1      | Grupo controle.....                                                     | 51        |
| 5.2.2      | Tilosina e lincomicina.....                                             | 52        |
| 5.2.3      | Enrofloxacina.....                                                      | 54        |
| 5.2.4      | Sulfaquinoxalina.....                                                   | 58        |
| 5.2.5      | Oxitetraciclina.....                                                    | 60        |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                   | <b>63</b> |
| <b>7</b>   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                  | <b>64</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de carne de frango, em 2017, foi de 13,05 milhões de toneladas (2º maior produtor mundial) e, deste total, 4,32 milhões de toneladas foram destinadas ao mercado externo, o que manteve o Brasil como maior exportador mundial deste produto (ABPA, 2018). A busca pela máxima eficiência produtiva levou a uma contínua agregação de novas tecnologias pelo setor avícola e os elevados índices de produtividade na avicultura estão diretamente ligados aos avanços tecnológicos na seleção genética, no manejo e na nutrição das aves. Entretanto, o atual cenário mundial da produção de alimentos revela a preocupação dos consumidores quanto à qualidade e a segurança do alimento a ser consumido.

A utilização de antimicrobianos e quimioterápicos em animais de produção contribui para a busca de uma atividade mais rentável. Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas capazes de inibir o crescimento de microrganismos ou eliminá-los. Em medicina veterinária, são utilizados na forma de agentes terapêuticos, profiláticos e também como aditivos químicos que funcionam como promotores de crescimento. O uso desses medicamentos no tratamento ou profilaxia é justificado pelo fato dos animais de produção estarem sujeitos a infecções, devido às situações de confinamento e ao estresse a que são normalmente submetidos, permitindo assim a manutenção dos padrões sanitários e de bem-estar dos animais, um dos objetivos importantes na produção em massa (Gustafson e Bowen, 1997; Doyle, 2006; Almeida, 2011).

Para o propósito de promoção de crescimento, drogas antimicrobianas são utilizadas como aditivos alimentares nas rações e são continuamente administradas em doses sub terapêuticas. Nesse caso, os antibióticos, são utilizados para controlar agentes patogênicos ao processo digestivo, promovendo melhora nos índices zootécnicos (aumento no ganho de peso, melhora da conversão alimentar e redução da mortalidade) e maximizando o desempenho animal. Estes aditivos promotores de crescimento têm proporcionado condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos benéficos do trato gastrointestinal, resultando em melhor digestão e absorção de nutrientes, além de melhorar a qualidade dos produtos finais. Há um consenso geral de que os efeitos benéficos do uso dos antibióticos como promotores de crescimento se devem ao controle da microbiota intestinal do animal (Companyó *et al.*, 2009).

Por outro lado, a utilização destes medicamentos em produção animal tem sido questionada, pois o acúmulo de seus resíduos em produtos de origem animal pode

provocar reações alérgicas e ocasionar o aparecimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, implicando em grande preocupação por parte de pesquisadores, autoridades sanitárias e consumidores de todos os países. Por esses motivos, a presença de resíduos de drogas nos alimentos de origem animal levou os órgãos oficiais de saúde pública a se posicionar em contra o uso dos antimicrobianos na produção animal e a proibição do uso destes em rações (principalmente com o propósito de promoção de crescimento) é crescente, de acordo com normas internacionais (Miltenburg, 2000; Bogialli e Corcia, 2009; Bondi *et al.*, 2009).

O cálculo do período de carência de uma droga nos tecidos é feito por um método estatístico proposto, em 1995, pelo *Committee for Veterinary Medicinal Products* (CVMP), que atua e regulamenta os assuntos relativos a medicamentos veterinários e refere-se ao tempo necessário para que a concentração de resíduos de uma determinada droga, ou de seus metabólitos, decaia a níveis iguais ou inferiores ao nível de tolerância nos tecidos de 99% dos animais do lote. Este nível de tolerância é compreendido como Limite Máximo de Resíduos (LMR). Os LMR, que são determinados por órgãos regulatórios como o Codex Alimentarius e o Comitê de Produtos Alimentares da Agência Europeia de Medicina (EMA), devem levar em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de uma substância, expressa em mg/kg de peso corporal, que pode ser ingerida diariamente na alimentação, durante toda a vida, sem oferecer riscos apreciáveis à saúde, à luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época de avaliação. A IDA, determinada para cada ingrediente ativo, é estabelecida com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos medicamentos veterinários, conduzidos em animais de laboratório e realizados em procedimentos reconhecidos em nível internacional. Para garantir que não sejam detectados resíduos acima do LMR, deve-se observar a via de administração, a dosagem aplicada e o cumprimento do período de carência de cada antimicrobiano. Dessa maneira, órgãos oficiais de saúde pública têm adotado medidas para o controle do uso de antimicrobianos ou contaminantes na produção animal, além de monitorar os resíduos gerados por essas drogas que podem acumular nos produtos de origem animal destinados ao consumo humano (Paturkar *et al.*, 2005; Doyle, 2006).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), com o objetivo de inspecionar e monitorar, baseando-se em análise de risco, a presença de resíduos de substâncias químicas que podem ser nocivas

ao consumidor. Esse plano foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, e contém tabelas que regulamentam o controle de antimicrobianos, de anabolizantes, de micotoxinas, de sulfonamidas, de metabólitos de nitrofuranos e de avermectinas, entre outros, nos produtos de origem animal (BRASIL, 1986; BRASIL, 1995).

As características farmacocinéticas, tais como a absorção, distribuição e eliminação, determinam as diferenças entre tempo de depleção de cada droga e, conseqüentemente, os períodos de carência indicados para cada formulação (Cornejo *et al.*, 2010). Nesse sentido, é de fundamental importância o conhecimento do metabolismo dos antimicrobianos nos diversos tecidos dos animais de produção de alimentos.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram realizar a pesquisa da presença e dos níveis de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de rins de frangos de corte que foram submetidos aos tratamentos farmacológicos com enrofloxacina, oxitetraciclina, sulfaquinoxalina, tilosina e lincomicina, utilizando um método analítico quantitativo e confirmatório, validado, para pesquisa de multirresíduos em rins de frangos de corte por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS) e determinar o período de depleção dos antimicrobianos utilizados para que não sejam detectados resíduos destes nos rins, acima dos LMR.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Agentes antimicrobianos**

Os antimicrobianos começaram a ser descobertos no final da década de 1920 e, assim que os primeiros compostos foram purificados, já passaram a ser utilizados na medicina humana e veterinária. A sua utilização na medicina veterinária foi aumentando consideravelmente, principalmente a partir da década de 1950. Esses medicamentos são reunidos em grupos de substâncias que apresentam semelhança na sua estrutura química ou em grupos de substâncias que apresentam o mesmo mecanismo de ação. Em medicina veterinária, eles podem ser administrados por injeção (intravenosa, intramuscular ou

subcutânea), oralmente, topicamente na pele, por infusão intra-mamária ou intra-uterina. Todas essas formas de aplicação podem gerar resíduos nos produtos de origem animal, principalmente quando administrados de forma incorreta ou abusiva, como por exemplo, não obedecendo ao tempo de carência para cada medicamento, dosagem incorreta, entre outros (Bondi *et al.*, 2009).

Os medicamentos são preparações industriais formuladas a partir de substâncias químicas e biológicas que promovem a prevenção, tratamento ou cura das mais diversas doenças dos animais, possibilitando maior bem-estar e produtividade. Em específico, os agentes antimicrobianos possuem atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, e o resultado da ação destes é a morte microbiana (microbiocida) ou inibição de crescimento (microbiostático). Podem ainda ser conceituados como compostos produzidos por microrganismos, ou seu equivalente sintético, que possuem atividade bactericida ou bacteriostática, atuando no tratamento de doenças infecciosas. Classificam-se entre aqueles obtidos de microrganismos (antibióticos) e compostos químicos sintéticos e semi-sintéticos (quimioterápicos ou antimicrobianos quimioterápicos). Quanto ao espectro de ação, podem ser divididos entre os de largo espectro, que têm atividade contra diversos microrganismos, e os de curto espectro que agem contra poucas espécies, sendo específicos para determinados grupos bacterianos (Englert, 1998; Spinosa *et al.*, 2002; Guiguère *et al.*, 2010).

Quanto à regulamentação, os medicamentos veterinários podem ser classificados em dois grandes grupos: grupo A, que corresponde a drogas de uso proibido no Brasil, e entre elas se destacam os esteróides anabolizantes, as  $\beta$ -agonistas, os tireostáticos, os anfenicóis e os nitrofuranos e; grupo B, que corresponde a drogas de uso permitido, porém com LMR estabelecido. Neste grupo se destacam  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclínas, macrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, glicopeptídeos e ionóforos (Concerning, 2002).

Apesar do grande número e da diversidade dos grupos de antimicrobianos, alguns deles, por motivos de mecanismo de ação e custo, são mais utilizados que outros. Os principais antimicrobianos usados em medicina veterinária estão incluídos nas seguintes classes: beta-lactâmicos, tetraciclínas, macrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, glicopeptídeos e ionóforos poliéster (Bondi *et al.*, 2009).

### 3.2. Antimicrobianos na avicultura

O foco na produtividade (ganho de peso e maior produção de carne) tornou-se desafiador para os animais de produção, selecionados geneticamente por décadas para esta habilidade, e com o mínimo de consumo de alimento e deposição de gordura. Para que o potencial genético das aves de corte seja potencializado é importante que alguns fatores estejam interagindo, como uma adequada nutrição e suficientes condições sanitárias de criação (higiene, vacinação e medicação, quando necessário), além de bem-estar (Corrêa *et al.*, 2003). Na produção de frangos de corte, os antimicrobianos são utilizados com os objetivos de tratamento (quando necessário para combater alguma doença), ou como aditivos promotores de crescimento (para a obtenção de alta produtividade) (Toledo *et al.*, 2007; Iafigliola *et al.*, 2000).

Atualmente são poucos os antimicrobianos aprovados pelo MAPA no Brasil para serem utilizados em rações de animais monogástricos, isso em virtude de uma rígida legislação implantada por organismos reguladores internacionais, além da constatação de que alguns produtos poderiam contribuir para o aparecimento de resistências ou reações de hipersensibilidade em humanos. Estes produtos devem ter algumas características que permitem classificá-los como promotores de crescimento, e, assim, tem seu uso restrito para essa finalidade. Dentre as características que distinguem os promotores de crescimento dos antimicrobianos de uso terapêutico, são o amplo espectro de ação sobre bactérias Gram positivas e a baixa absorção intestinal o que evita a deposição nos produtos comestíveis pelo homem (Ungemach *et al.*, 2006; Tylova *et al.*, 2010). Alguns dos antimicrobianos aprovados pelo MAPA para uso permitido em avicultura no Brasil estão descritos na Tab 1.

**Tabela 1.** Alguns antimicrobianos utilizados em aves.

| <b>Grupo Farmacológico</b> | <b>Mecanismo de Ação</b>                                                      | <b>Ação Biológica</b>                                     | <b>Antimicrobiano</b> | <b>Espectro de Ação</b>   |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <b>Macrolídeos</b>         | Inibição da síntese protéica (subunidade 50 S do ribossomo)                   | Bacteriostáticos ou Bactericidas (em doses elevadas)      | Azitromicina          | Espiroquetas              |
|                            |                                                                               |                                                           | Claritromicina        | Gram-negativos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Eritromicina          | Gram-positivos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Espiramicina          | (bacilos)                 |
|                            |                                                                               |                                                           | Tilosina              | Micoplasma                |
|                            |                                                                               |                                                           | Tilmicosina           |                           |
| <b>Lincosamidas</b>        | Inibição da síntese protéica (subunidade 50 S do ribossomo)                   | Bacteriostáticos ou Bactericidas (na dependência da dose) | Tiamulina             |                           |
|                            |                                                                               |                                                           | Lincomicina           | Gram-negativos            |
| <b>Quinolonas</b>          | Inibição do DNA girasse comprometendo a replicação e função do ácido nucléico | Bactericidas                                              | Clindamicina          | Gram-positivos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Ácido oxonílico       | Gram-negativos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Flumequina            | Gram-positivos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Norfloxacin           | Micoplasma                |
|                            |                                                                               |                                                           | Enrofloxacin          | Baixo contra espiroquetas |
|                            |                                                                               |                                                           | Ciprofloxacina        |                           |
| <b>Sulfonamidas</b>        | Análogo do PABA que é importante para a síntese de ácido fólico da bactéria   | Bacteriostáticos                                          | Sulfadiazina          | Espiroquetas              |
|                            |                                                                               |                                                           | Sulfapirimidina       | Gram-negativos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Sulfametoxazol        | Gram-positivos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Sulfadimetoxina       | Micoplasma                |
|                            |                                                                               |                                                           | Sulfaquinoxalina      |                           |
| <b>Tetraciclínas</b>       | Inibição da síntese protéica (subunidade 30 S do ribossomo)                   | Bacteriostáticos                                          | Clortetraciclina      | Espiroquetas              |
|                            |                                                                               |                                                           | Oxitetraciclina       | Gram-negativos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Tetraciclina          | Gram-positivos            |
|                            |                                                                               |                                                           | Doxiciclina           | Micoplasma                |

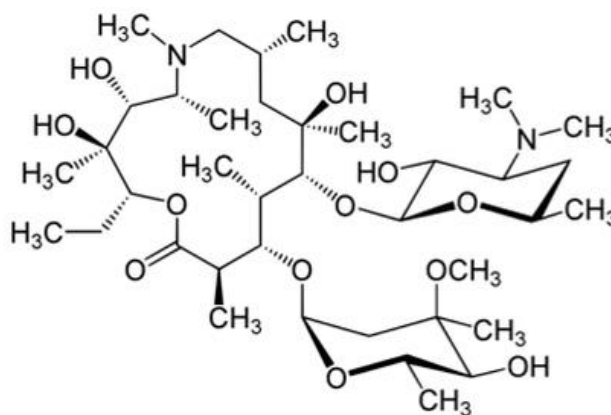
**Fonte:** Adaptado do livro Farmacologia Aplicada a Avicultura (Palermo-Neto *et al.*, 2005)

### 3.3. Macrolídeos

Os macrolídeos constituem um grupo de antibióticos formados quimicamente por um anel macrocíclico de lactona, ao qual se ligam um ou mais açúcares, e, em sua maioria, são produzidos pelo fungo *Streptomyces* spp. (Fig.1). São agentes bacteriostáticos ou bactericidas, variando conforme a sua concentração e a ação bactericida é tempo-dependente, ou seja, o fator de maior importância para determinar a eficácia é o período

de tempo durante o qual a concentração plasmática fica acima da concentração inibitória mínima de uma dada bactéria. As principais drogas pertencentes a esta classe são a eritromicina, a claritromicina, a azitromicina, a espiromicina e a tilosina (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

**Figura 1.** Estrutura base dos macrolídeos



### 3.3.1. Propriedades químicas e mecanismo de ação

Os macrolídeos ligam-se de forma reversível à porção 50 S do ribossomo inibindo a síntese protéica atuando sobre a translocação, e assim inibem a translocação do RNA transportador no local aceitor do aminoácido, interferindo na adição de novos aminoácidos e, dessa forma, impedindo a síntese proteica da célula do microrganismo (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

### 3.3.2. Farmacocinética e período de carência

Tem como vantagem terapêutica sua ampla distribuição nos tecidos e meia vida prolongada, tendendo a se concentrar em algumas células por causa de seu caráter básico, sendo então captadas por células que têm o pH mais ácido que o do plasma. As concentrações teciduais de eritromicina, tilosina e tilmicosina são maiores que as concentrações plasmáticas, particularmente nos pulmões, sendo, por isso, indicadas para o tratamento de infecções pulmonares. A biotransformação dos macrolídeos é feita pelas enzimas microssomais hepáticas e a eliminação é via bile e fezes. A tilosina, por exemplo, é bem absorvida no trato gastrointestinal e não necessita de formulações especiais para manter sua estabilidade no estômago (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

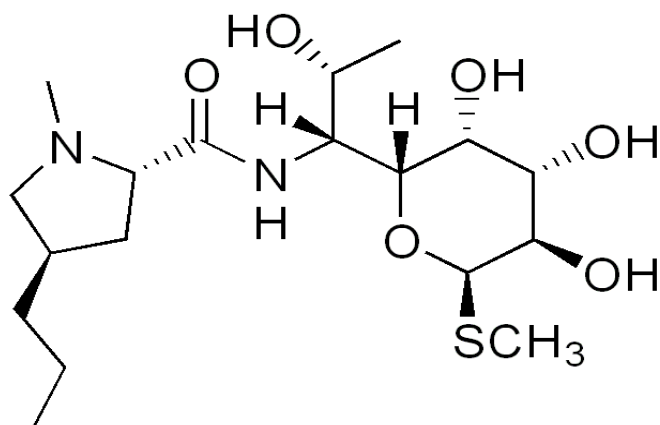
### 3.3.3. Indicação de uso

Os macrolídeos são compostos ativos de bom espectro que agem como bactericidas ou bacteriostáticos, principalmente contra bactérias Gram-positivas, sendo utilizadas na prevenção, controle e tratamento de doenças infecciosas e respiratórias específicas de aves causadas por *Mycoplasma* sp., *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium* spp., *Neisseria* sp., *Moraxella* spp. e *Mycobacterium avium*, estafilococoses, estreptococoses. Dentre os macrolídeos, a tilosina é muito usada como promotor de crescimento, incorporados em níveis subterapêuticos na ração de frangos de corte na forma de premix, na forma solúvel em água, e ainda de forma injetável. A biotransformação é feita pelo fígado e a excreção pela bile e fezes, semelhante aos demais macrolídeos. A tilosina pode ainda ser utilizada como auxiliar nos programas de erradicação de micoplasmas aviários quando se faz uso contínuo de doses preventivas na ração, intercaladas em doses curativas (Spinosa *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2005; Palermo-Neto *et al.*, 2005; Guiguère *et al.*, 2010; Spisso, 2010; Assis, 2015). Para uso no Brasil estão comercialmente disponíveis a tilosina, espiramicina, eritromicina e tilmicosina (Ito *et al.*, 2005; Spinosa *et al.*, 2011).

### 3.4. Lincosamidas

As lincosamidas são monoglicosídeos ligados a um aminoácido (Fig. 2) podendo ser agentes bactericidas ou bacteriostáticos, dependendo da concentração da droga, da espécie bacteriana e do inócuo de bactérias. As principais drogas pertencentes a esta classe são a lincomicina e a clindamicina (Spinosa *et al.*, 2011).

**Figura 2.** Estrutura da lincomicina



### 3.4.1. Propriedades químicas e mecanismo de ação

As lincosamidas inibem a síntese proteica da célula bacteriana ao se ligarem à subunidade 50 S do ribossomo, da mesma forma como fazem os macrolídeos. São antibióticos bacteriostáticos; podem ser bactericidas em altas concentrações. A ação bactericida é tempo-dependente e os parâmetros que melhor exprimem sua eficácia antimicrobiana é a relação sob a curva e a concentração inibitória mínima (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

### 3.4.2. Farmacocinética e período de carência

As lincosamidas apresentam alta solubilidade e consequentemente grande volume de distribuição, sendo bem absorvidas no intestino de animais não herbívoros e eliminadas principalmente por metabolismo hepático, embora parte seja eliminada na forma ativa na urina (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

### 3.4.3. Indicação de uso

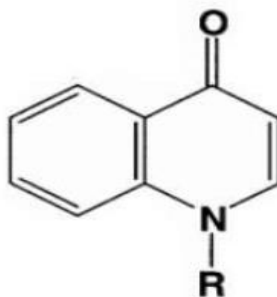
Este grupo de antibiótico tem espectro antimicrobiano moderado, atuando principalmente sobre bactérias Gram-positivas, aeróbios e anaeróbios, e algumas bactérias Gram-negativas como *Campylobacter* spp., recomendando-se o seu uso para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Dentre as lincosamidas, a lincomicina é utilizada como aditivo promotor de crescimento com o objetivo de melhorar o ganho de peso e a conversão alimentar de frangos de corte. A combinação lincomicina-espectiomicina é administrada por via oral a fim de controlar infecção de sacos aéreos causada por *Mycoplasma* sp. e doença respiratória crônica – (DRC) complicada provocada por *Mycobacterium gallisepticum* e no controle de enterite necrótica causada por patógenos sensíveis como *Clostridium perfringens*. (Spinosa *et al.*, 2002; Palermo-neto *et al.*, 2005; Guiguère *et al.*, 2010; Spisso, 2010; Assis, 2015).

## 3.5. Quinolonas

Quinolonas e fluorquinolonas são antimicrobianos sintéticos derivados do ácido nalidíxico (Fig. 3). São compostos químicos que possuem potencial bactericida e são

utilizados no tratamento de infecções bacterianas com amplo espectro de ação. Os principais representantes desse grupo são a enrofloxacin, norfloxacin, flumequina e ciprofloxacina (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

**Figura 3.** Estrutura base das quinolonas



### 3.5.1. Propriedades químicas e mecanismo de ação

As quinolonas inibem a replicação da DNA girase bacteriana (ou topoisomerase II), impedindo a realização do super-enovelamento do DNA, necessário para o empacotamento da célula bacteriana. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, levando à morte das bactérias (Madigan *et al.*, 2004; Palermo-Neto *et al.*, 2005).

### 3.5.2. Farmacocinética e período de carência

A enrofloxacin é absorvida rapidamente após administração oral e bem distribuída por todo o organismo e a excreção de seus metabólitos ocorre pela via renal e pela bile. A ciprofloxacina é um metabólito da enrofloxacin, porém farmacologicamente diferente com metade ou menos da metade de biodisponibilidade no organismo da ave (Palermo-Neto *et al.*, 2005).

### 3.5.3. Indicação de uso

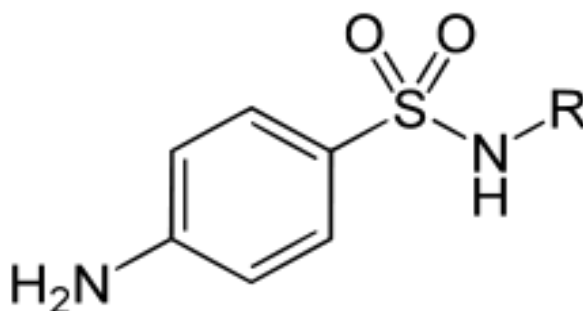
Quinolonas são indicadas no tratamento de bactérias Gram-negativas aeróbias e microaerófilas, particularmente enterobactérias. Dentre as quinolonas, a enrofloxacin é recomendada para o tratamento de aves com infecções por *Escherichia coli*, *Pasteurella*

*multocida*, coriza infecciosa das galinhas, infecções por *Ornithobacterium rhinotracheale*, celulite por Gram-negativos, *Salmonella* spp., *Campylobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Clamidia* sp. e *Mycobacterium* sp., dentre outras infecções. Também são sensíveis às quinolonas, tendo efeito intermediário e variável os microrganismos *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp.. O uso de quinolonas em aves tem sido facilitado no Brasil por uma legislação de prescrição muito flexível, especialmente no tratamento de lotes de aves infectadas pela *Salmonella* Enteritidis, porém é proibido nos Estados Unidos desde 2005, com a justificativa de que a utilização de fluorquinolonas em frangos de corte leva ao desenvolvimento de *Campylobacter* spp. resistentes a estes antimicrobianos (Spinosa *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2005; Palermo-Neto *et al.*, 2005; Guiguère *et al.*, 2010; Caldeira, 2012; Assis, 2015).

### 3.6. Sulfonamidas

As sulfonamidas são um grupo de antimicrobianos com amplo espectro de ação com atividade sobre bactérias (Gram-negativas e Gram-positivas). Os termos sulfonamidas, sulfonamídicos ou simplesmente sulfas são comumente empregados como denominações genéricas dos derivados de para-aminobenzenossulfonamida (sulfonilamida), portanto, um análogo estrutural do ácido p-aminobenzoico (PABA), substância essencial para a síntese de ácido fólico, que por sua vez, quando em sua forma reduzida é fundamental para a síntese de DNA e RNA bacteriano (Fig. 4). Algumas das principais drogas pertencentes a esta classe são a sulfadiazina, a sulfapirimidina e a sulfaquinoxalina (Spinosa *et al.*, 2002).

**Figura 4.** Estrutura base das sulfonamidas



### 3.6.1. Propriedades químicas e mecanismo de ação

As sulfonamidas quando administradas em concentrações terapêuticas, são bacteriostáticas; em concentrações altas, são bactericidas, sendo que, nessas altas concentrações, podem causar graves reações adversas ao hospedeiro, como supressão da medula óssea, trombocitopenia, depressão linfóide e imunológica. Em determinadas circunstâncias esses efeitos podem causar diminuição da taxa de crescimento de frangos de corte e perus. Alterações post-mortem incluem infartos hemorrágicos no fígado e no baço, medula óssea pálida e hemorragias petequiais ou equimoses nos músculos. Como se trata de antagonismo competitivo entre as sulfas e o PABA, a alta concentração de um deles desloca o outro. Deste modo, deve-se evitar o uso concomitante de compostos derivados do PABA, como por exemplo, a procaína (Madigan *et al.*, 2004; Palermo-Neto *et al.*, 2005; Górnaiak, 2011).

### 3.6.2. Farmacocinética e período de carência

Após a administração oral das sulfonamidas, haverá absorção, podendo a taxa desta variar enormemente, dependendo do tipo de sulfonamidas empregada. A biotransformação é feita pelo fígado, principalmente por acetilação e oxidação, e a eliminação se faz por via renal na forma ativa, ou como metabólito por filtração glomerular, embora possa haver também secreção tubular. Algumas sulfas, como a sulfadiazina, podem sofrer reabsorção tubular. Uma pequena proporção de sulfonamidas pode ser eliminada através de secreções como saliva, suor e leite (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

### 3.6.3. Indicação de uso

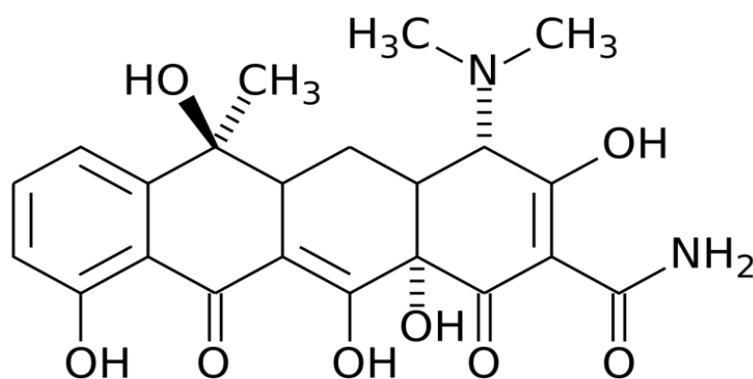
Na avicultura, as sulfonamidas são administradas principalmente pela via oral. Além de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, atuam também contra clamídias, protozoários, tais como coccídios, *Toxoplasma sp.* e *Cryptosporidium sp.* e alguns anaeróbios. Têm sido extensivamente utilizadas como agentes terapêuticos, principalmente para o controle da coccidiose, pulrose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas, sendo a sulfaquinoxalina a mais utilizada na avicultura. São administradas na água ou na ração e após a ingestão e absorção são biotransformadas no

fígado e pulmão. Na ausência de resistência bacteriana as sulfonamidas são preferências entre os antimicrobianos por possuírem vantagens como a boa distribuição por todos os tecidos do organismo, além de baixo custo (Spinosa *et al.*, 2002; Palermo-Neto *et al.*, 2005; Guiguère *et al.*, 2010; Assis, 2015).

### 3.7. Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*, algumas são semissintéticas e compreendem um grupo de antimicrobianos usados terapêutica e profilaticamente em animais de produção. São assim denominadas por causa da sua estrutura química, formada por quatro anéis benzênicos (Fig. 5). Os principais representantes desse grupo são a tetraciclina, a clortetraciclina e a oxitetraciclina (Palermo-Neto *et al.*, 2011).

**Figura 5.** Estrutura básica das tetraciclinas



#### 3.7.1. Propriedades químicas e mecanismo de ação

Estes antimicrobianos inibem a síntese proteica dos microrganismos sensíveis, ligando-se aos ribossomos. Após penetrarem no interior da bactéria por um processo mediado por carreador, ligam-se reversivamente à subunidade 30 S do ribossomo do microrganismo, impedindo que o RNA-transportador se fixe ao ribossomo, com isto, faz com que a síntese proteica seja inibida (Landoni e Albarellos, 2015; Palermo-Neto *et al.*, 2011).

### 3.7.2. Farmacocinética e período de carência

As tetraciclinas atingem ampla distribuição corpórea logo após serem absorvidas no trato digestivo, são metabolizadas no fígado e excretadas na forma ativa pelo rim, e em menor parte pela bile e fezes. As diferenças quanto ao espectro de ação destas drogas são devidas, principalmente, a seu grau de solubilidade lipídica (Palermo-Neto *et al.*, 2005).

### 3.7.3. Indicação de uso

As tetraciclinas mais comumente utilizadas na avicultura são clortetraciclina, tetraciclina e oxitetraciclina e são considerados de amplo espectro, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e ainda em clamídeas, micoplasmas, ricketzias, anaeróbios e alguns protozoários (*Anaplasma* spp., *Theileria* spp.). São indicadas para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp., colibaciloses, micoplasmoses, aerossaculites provocadas por *Escherichia coli*, infecções por *Pasteurella multocida* e *Haemophilus paragallinarum*. Além do seu uso no tratamento de infecções, principalmente respiratórias e gastrointestinais, as tetraciclinas também foram extensivamente utilizadas como promotor de crescimento para frangos de corte, prevenindo infecções oportunistas em períodos de estresse e enterites, prevenção ou tratamento da DRC, cólera aviária, sinovite causada por *Mycoplasma synoviae* e coccidioses. Possuem baixa toxicidade além de custo acessível, podendo ser administradas por via oral, sendo a oxitetraciclina uma das mais utilizadas. (Spinosa *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 2004; Palermo-Neto *et al.*, 2005; Guiguère *et al.*, 2010; Landoni e Albarellos, 2015; Assis, 2015).

## 3.8. Resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal

A preocupação com o uso de medicamentos veterinários nos animais de produção, cujos resíduos podem resultar em risco à saúde pública, levam toda cadeia produtiva a ter uma atenção maior nesta etapa, principalmente o consumidor. O uso incorreto de antimicrobianos em medicina veterinária pode deixar resíduos nos produtos de origem animal e a presença desses nos alimentos tem potencial para ocasionar diferentes reações na saúde humana, dentre elas a ocorrência de episódios de reações alérgicas em pessoas

com hipersensibilidade, além de mutagenicidade, modificações na microbiota normal e, principalmente, contribuir para a disseminação da resistência microbiana. Tais conhecimentos tornam-se bastante relevantes no que diz respeito à saúde pública e as relações internacionais de comércio (Portugal, 2003; Stolker e Brinkman, 2005).

Entende-se por período de carência (de retirada, de depleção ou de depuração) o tempo necessário para que o resíduo de preocupação toxicológica atinja concentrações seguras, ou ainda o intervalo de tempo necessário, em horas ou dias, que deve ser observado entre a aplicação do agente e a liberação para o consumo do produto de origem animal (carne, leite, ovos e mel), oriundo do animal tratado. Esse intervalo de tempo é importante para que o resíduo do medicamento atinja uma concentração segura, de acordo com os níveis de tolerância estabelecidos. Também pode referir-se ao intervalo de tempo exigido para que se retire o medicamento antes do abate. A observância do período de carência é, portanto, essencial para que o alimento não possua resíduo do produto em níveis acima do LMR permitido. Vários fatores contribuem para a determinação do período de carência, dentre os quais, os constituintes da fórmula farmacêutica, a dose administrada, a via de administração e a espécie animal (Booth e Mc Donald, 1992; Palermo-Neto *et al.*, 2005; Paturkar *et al.*, 2005; Doyle, 2006).

Ao administrar uma medicação, eventual ou rotineira, envolvendo um grupo ou mesmo lotes inteiros de animais próximos à idade de abate, deve-se atentar para o cumprimento dos prazos de carência indicados pelo fabricante para que ocorra a sua eliminação completa ou de seus metabólitos pelo organismo do animal. Nesse sentido, o período de carência para cada antimicrobiano administrado deve ser conhecido e rigorosamente obedecido pelos médicos veterinários responsáveis pela prescrição dos medicamentos e elaboração dos programas de medicação nas granjas (Sobestiansky, 2007; Lanza, 2016).

O desrespeito ao período de carência pode gerar grandes impactos em toda a cadeia produtiva animal em questão, desde impactos econômicos, como embargos para mercados e penalizações para os produtores, como também impactos de saúde pública, como os possíveis danos à saúde humana quando são alimentados com carne ou leite contendo resíduos de medicamentos veterinários (Blood e Radostitis, 1991; Booth e Mc Donald, 1992).

O risco da ingestão de alimentos contendo resíduos de antimicrobianos está na resistência bacteriana a estas drogas, um problema cada vez mais importante, tanto em humanos quanto em animais. O amplo, e algumas vezes, indiscriminado uso dessas

drogas resulta na seleção de bactérias que são inerentemente resistentes. A resistência a um agente antimicrobiano frequentemente resulta em resistência cruzada com outros agentes da mesma classe. Essa forma de resistência é encontrada com sulfonamidas, tetraciclina, macrolídeos e aminoglicosídeos (Miltenburg, 2000; Rocha, 2016).

Considerando a possibilidade de que resíduos de medicamentos presentes em produtos de origem animal venham a causar efeitos adversos à saúde humana, foram estabelecidos níveis de tolerância após estudos. No Brasil, é competência do MAPA estabelecer estes valores, considerando-se as recomendações do *Codex Alimentarius* da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Assim, através de Instruções Normativas publicadas anualmente, o MAPA determina o plano de amostragem e os limites de referência para diferentes antimicrobianos em diferentes produtos de origem animal (BRASIL, 2018a).

As concentrações dos resíduos dos fármacos no organismo variam consideravelmente de tecido para tecido. Geralmente, observam-se níveis mais elevados em tecidos de estocagem ou em órgãos que metabolizam e excretam os antibióticos como nos rins, no fígado e/ou na gordura corpórea onde estes resíduos, geralmente, são encontrados em maiores concentrações (Booth e Mc Donald, 1992). Baseado nesta teoria, o MAPA tem recomendado que as análises para controle de qualidade de carnes sejam realizadas, além do músculo, também em rim ou em fígado dos animais de produção (Rocha, 2016; Assis, 2015).

### **3.9. Regulamentação sobre a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal**

As regulamentações sobre a presença de resíduos nos produtos de origem animal foram desenvolvidas no âmbito nacional e internacional e visam harmonizar os valores de LMR para diferentes combinações de fármacos e matrizes. O estudo dos potenciais efeitos da ingestão de alimentos contendo estas substâncias em concentrações superiores aos limites estabelecidos é de grande relevância para a saúde pública, assim como para o comércio internacional (Hoff, 2008).

Existem diversas organizações envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle da utilização de medicamentos veterinários na produção animal. Esses mecanismos incluem: controle da distribuição e o uso em animais, a determinação de níveis seguros de resíduos nos alimentos de origem animal e as metodologias empregadas

para detecção e quantificação de resíduos. Entretanto, as legislações podem diferir consideravelmente entre diferentes países, especialmente em regiões em desenvolvimento, quando, em muitos casos, órgãos reguladores ainda estão sendo criados e desenvolvidos. Além disso, LMR não são estabelecidos para todos os antibióticos encontrados em produtos de origem animal (Spinosa e Tárraga, 2011).

Com a finalidade de proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, foi criado, em 1963, o *Codex Alimentarius*, um Programa Conjunto da FAO e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da normalização sobre alimentos. O Codex é responsável pela análise crítica da literatura existente sobre a toxicidade de cada antimicrobiano usado como medicamento veterinário fixando as IDA e os respectivos LMR. Na década de 1970, o Brasil tornou-se membro deste Programa e, em 1980, foi criado o Comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB), por meio das Resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO). O CCAB têm como principais finalidades a participação, em representação do país, nos comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas Codex como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos (Paschoal *et al.*, 2008; Palermo-Neto *et al.*, 2011; CODEX, 2018).

Outros órgãos internacionais incluem a EMEA e a Organização Mundial da Sanidade Animal (OIE). Além destes, alguns países têm grupos de especialistas envolvidos, como a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), nos Estados Unidos, o Departamento de Medicamentos Veterinários (Bureau of Veterinary Drugs), no Canadá, e a Comissão de Produtos Veterinários do Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods), na Inglaterra (Caldeira, 2012).

No Brasil, foi instituído o PNCRC que tem o objetivo de inspecionar e monitorar, a presença de resíduos de substâncias químicas que podem ser nocivas ao consumidor. Segundo a Instrução Normativa nº 42, de 1999, a competência para estabelecer os LMR em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No caso de não estarem estabelecidos, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Europeia, ou ainda, os adotados pelo FDA (Lima, 2016).

Mais recentemente, a portaria Nº 171, de 13 de dezembro de 2018 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) abriu consulta pública para informar sobre a intenção de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos, um passo importante para a possibilidade de proibição destas drogas, em definitivo, para uso em animais de produção (BRASIL, 2018b).

### **3.10. Métodos analíticos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos**

Para a pesquisa e estudo da presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, em conformidade com a legislação vigente, é imprescindível a disponibilidade de métodos rápidos, confiáveis e sensíveis. Para serem eficientes, esses métodos devem apresentar alta sensibilidade e seletividade, além de serem executados por laboratórios com adequada capacidade técnica e analítica. Os métodos analíticos desenvolvidos precisam ser de alta confiabilidade, que é garantida com o emprego de procedimentos de validação bem elaborados e definidos, visando assegurar a disponibilidade de alimentos mais seguros para o consumidor. A presença de resíduos pode ser detectada por diversos métodos analíticos, dentre os quais se destacam os ensaios físico-químicos que utilizam técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (Paschoal *et. al.*, 2008).

As metodologias analíticas utilizadas para a determinação de substâncias tóxicas em alimentos devem ser capazes de quantificar os resíduos em concentrações muito baixas, assim como identificá-los de maneira inequívoca. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS) possibilita a obtenção de informações estruturais acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características do tempo de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, utilizando HPLC/MS-MS é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas (Lima, 2016).

Devido à elevada seletividade, os efeitos da interferência de componentes da matriz sobre o sinal obtido são minimizados, de forma que procedimentos mais simples de preparo das amostras podem ser empregados, eliminando, muitas vezes, a necessidade

de realizar várias etapas de purificação da amostra. Isto diminui o custo e o tempo necessários para a realização das análises, de forma que possam ser aplicadas como procedimentos de rotina em laboratórios de controle da qualidade de alimentos. Além disso, a HPLC/MS-MS possibilita a obtenção de menores limites de detecção e quantificação quando comparada à HPLC/MS, devido aos modos de varreduras possíveis de serem realizados, o que pode favorecer sua aplicação à análise de resíduos em níveis traços (Chiaradia *et al.*, 2008).

### **3.10.1. Métodos físico-químicos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos**

Uma técnica analítica para análises de resíduos em alimentos é a HPLC/MS-MS, devido a sua alta seletividade e sensibilidade. Esta técnica combina separação física, realizada pela cromatografia líquida, com a análise de massas possibilitada pela espectrometria, e se tornou promissora por permitir a identificação de resíduos de antimicrobianos em níveis baixos (Pastore, 2018).

#### **3.10.1.1. Técnica de extração em fase sólida (EFS) para análise de resíduos**

A etapa de preparo de amostras é um pré-requisito para obtenção de dados precisos, com resultados analíticos de qualidade. É uma das etapas mais demorada e trabalhosa, pois é nela que se removem os componentes interferentes da matriz, concentra-se a substância a ser analisada, aumentando a sensibilidade, e converte-se o analito em forma adequada para ser separado e extraído. A escolha adequada da técnica de preparo de amostra depende da natureza da amostra, da matriz, das características do analito e da técnica analítica que será empregada na determinação, uma vez que os analitos se apresentam nas matrizes de forma bastante variada, muitas vezes não se encontrando na forma da droga originalmente administrada, mas sim na forma de derivados ou metabólitos (Yang e Wang, 2013).

A extração em fase sólida (EFS), introduzida em 1976 para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido, atualmente é uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos como HPLC, cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). A técnica permite o fracionamento completo dos componentes da matriz da amostra bem como a capacidade de eluir seletivamente um

único composto ou várias classes de compostos da mesma amostra. Esse método tem sido muito utilizado em pesquisas na área ambiental, farmacêutica, alimentícia, clínica, entre outras, sendo aplicado no isolamento de drogas em tecidos de animais de origem alimentar, mas também tem encontrado ampla aplicação na análise de herbicidas, pesticidas e poluentes de tecidos animais, frutas, vegetais e outras matrizes (Huck e Bonn, 2000; Poole, 2003).

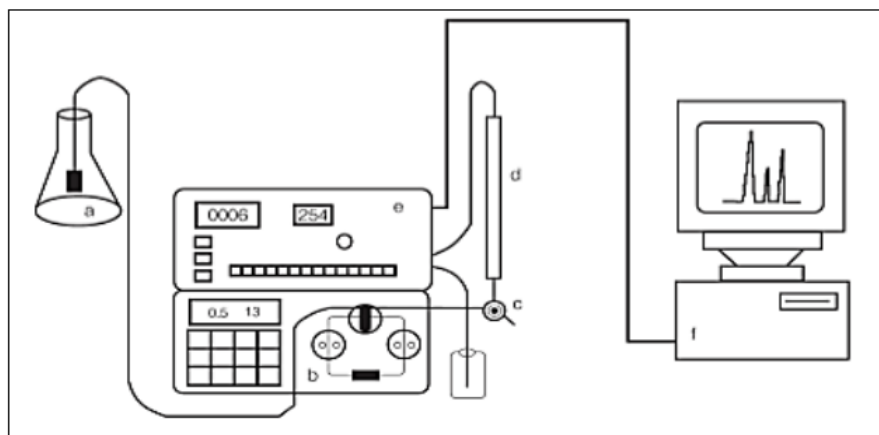
#### **3.10.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A cromatografia é um método de separação de compostos químicos em solução, utilizado para identificar e quantificar cada componente em uma mistura. É um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura e que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A técnica leva o nome da fase móvel, cromatografia líquida, em que o fluido é um solvente líquido (Cass e Degani, 2001; Niessen, 2006).

No HPLC, a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é percorrida pela fase móvel. As forças físicas e químicas atuantes entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos analitos sobre a coluna cromatográfica, sendo a separação individual dos componentes regulada pela magnitude dessas forças. Assim, analitos fortemente retidos pela fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, como consequência, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária, condição a qual é referida como tempo de retenção do composto (Skoog *et al.*, 2002; Penteado *et al.*, 2008; Lanças, 2009; Pastore, 2018).

O sistema HPLC é constituído basicamente pelos seguintes componentes: reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de injeção de amostras, coluna cromatográfica, detector e sistema de registro e tratamento dos dados, conforme ilustrado na Fig. 6 (Skoog *et al.*, 2002).

**Figura 6.** Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência: a) Reservatório da fase móvel; b) Bomba; c) Válvula de injeção da amostra; d) Coluna cromatográfica; e) Detector e f) Registrador



O processo de separação cromatográfica tem início quando a amostra é injetada na válvula de injeção e transportada, por meio de um sistema de bombas de alta pressão, pela fase móvel em direção à coluna (fase estacionária), onde é realizado o processo de separação dos analitos. O efluente da coluna segue então para o detector, que identifica a presença dos analitos eluídos da coluna e gera um sinal, que é captado e tratado no computador, através de um cromatograma, o qual exibe a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (Dong, 2006; Snyder e Kirkland, 2009).

As fases móveis utilizadas no HPLC devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, recomendando-se sua filtração e degaseificação antes do uso. A bomba, por sua vez, deve assegurar ao sistema um fluxo contínuo e adequado da fase móvel, sem pulsos e com alta reprodutibilidade. As colunas utilizadas no HPLC são geralmente de aço inoxidável, de comprimento variável e podendo ser reaproveitadas, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (Degani *et al.*, 1998). Os detectores possuem a função de identificar e quantificar os analitos, mesmo em concentrações extremamente baixas, podendo existir em diversas formas: detector espectrofotométrico (UV), de índice de refração, de dispersão de luz, de fluorescência, eletroquímicos, de massa (Porto, 2014).

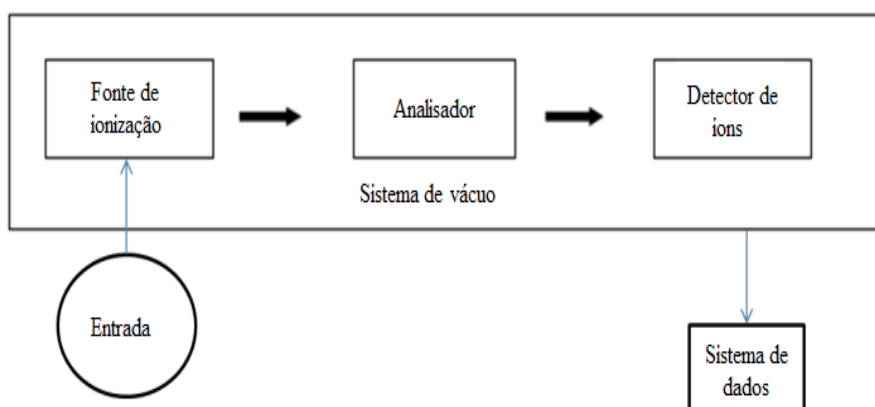
A utilização do HPLC para análise de resíduos tem suas limitações, visto que a utilização dos tempos de retenção como técnica de identificação dos analitos pode estar sujeita a erros de interpretação. Isso ocorre devido ao fato de que compostos distintos podem apresentar o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas

empregadas, o que resultaria na coeluição destes analitos e na possível geração de pico cromatográfico que não corresponda verdadeiramente ao analito de interesse (Lanças, 2009; Pastore, 2018).

### 3.10.1.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massa é uma técnica instrumental fundamentada na fragmentação de moléculas no estado gasoso através de bombardeamento de feixe de elétrons, cujo resultado é expresso na forma de espectros de massas. O equipamento é composto basicamente por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e um detector de íons, conforme ilustrado na Fig. 7 (Guerrera e Kleiner, 2005).

**Figura 7.** Componentes básicos de um espectrômetro de massas



Na espectrometria de massas, primeiramente os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte de ionização, que pode ser do tipo electrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) ou fotoionização a pressão atmosférica (APPI), entre outros. Em seguida, os íons formados são direcionados ao analisador de massas, que os separa conforme sua razão massa-carga ( $m/z$ ) ou promove fragmentação dos mesmos. Por fim, ao atingirem o detector, os íons geram sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas, o que torna possível, a partir de então, estimar ou obter o valor exato da massa nominal dessas moléculas (Guerrera e Kleiner, 2005; Hoffmann e Stroobant, 2007; Pastore, 2018).

### 3.10.1.3.1. Fontes de ionização por electrospray (ESI)

O modo de ionização ESI baseia-se na aplicação, à pressão atmosférica, de um forte campo elétrico (spray eletrolítico) sobre uma névoa da solução contendo a amostra, resultando na formação de compostos carregados na entrada do espectrômetro de massas. Formam-se então gotículas com excesso de carga (positiva ou negativa). A evaporação do solvente (dessolvatação), devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotículas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas. Este processo continua até que sejam produzidos íons do analito, os quais são transferidos para o analisador por uma série de dispositivos de focalização (Guerrera e Kleiner, 2005; Assis *et al.*, 2016).

A fonte de ionização ESI é considerada ideal para a análise de moléculas mais polares, como proteínas, aminoácidos e substâncias de interesse na área da bioanalítica, sendo muito aplicada para determinações de compostos nas áreas de alimentos e farmacêutica (Lanças, 2009). O fato de a ESI ionizar moléculas diretamente da solução também a torna acessível para ser conectada com métodos de separação cuja fase móvel é um líquido (Guerrera e Kleiner, 2005).

### 3.10.1.3.2. Analisadores de massa

Os analisadores de massas são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão  $m/z$ , podendo existir sob diversos tipos: quadrupolo, ion trap, tempo de voo, ou *time of flight* (ToF), entre outros. O quadrupolo tem como principal vantagem a simplicidade, facilidade de operação, baixo custo e boa linearidade em análises quantitativas. O sistema é constituído de quatro barras metálicas paralelas e equidistantes entre si, dispostas em dois pares, sendo um par de barras mantido em potencial elétrico positivo e outro par em potencial negativo. Nestas barras é aplicada uma combinação de corrente contínua (Cc) e radiofrequência (Rf) durante a passagem dos íons pelo quadrupolo, sendo que o par positivo de barras funciona como um filtro para massas mais elevadas, e o par negativo atua como um filtro para massas menores. Dessa forma, conforme o campo elétrico é gerado, pode-se fazer com que íons com relação massa/carga específica atinjam o detector, enquanto que íons não selecionados sejam desviados e neutralizados, ao se colidirem com as hastes (Ekman *et al.*, 2009; Lanças, 2009).

#### **3.10.1.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS)**

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tornou-se a técnica de escolha para análise de resíduos de medicamentos em alimentos, uma vez que combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informações estruturais, da massa molar e maior seletividade), o que garante a detecção e a confirmação inequívoca da identidade um composto específico (Vékey, 2001; Pastore, 2018).

Outro benefício do uso desse sistema é a possibilidade da análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas sequencial (MS/MS), que, ao invés de empregar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão  $m/z$  gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (EM1 e EM2), no qual um deles tem a finalidade de isolar o íon de interesse, e o outro é usado para estabelecer uma relação entre o íon isolado e outros íons gerados a partir da sua decomposição induzida. Este procedimento favorece ainda mais a elucidação estrutural da molécula, uma vez que aumenta a detectabilidade do analito e reduz a interferência espectral de outros compostos presentes na matriz, já que os íons fragmentados formados são característicos para cada composto (Ardrey, 2003; Dooley, 2003; El-Aneed *et al.*, 2009).

#### **3.11. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em frangos de corte**

Diversos produtos de origem animal podem ser utilizados como matriz para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos destacando-se o rim, o fígado, o músculo, a gordura e a pele. Quando o objetivo é avaliar a metabolização da droga, fígado e rins são os tecidos mais interessantes de serem analisados, porém quando a intenção é o conhecer o risco para o consumo humano o foco passa ser o músculo por corresponder ao tecido que é mais consumido, entretanto, esta matriz apresenta grandes variações na distribuição dos resíduos, além de ser o tecido com menor probabilidade de acúmulo de resíduos quando comparado ao fígado e rim (Becker *et al.*, 2004; Hammel *et al.*, 2008; Companyó, 2009; Kinsella *et al.*, 2009).

Rocha (2014), desenvolveu e validou dois métodos para determinação de doze antibióticos da classe das Fluorquinolonas, em músculo e rim de frangos de corte. Para o preparo das amostras das duas metodologias utilizadas, foi otimizado um método de

extração QuEChERS, que possui como vantagens, frente aos métodos tradicionais, de ser rápido, de fácil execução e de baixo custo. O primeiro método validado, que envolveu o uso da técnica HPLC-MS/MS para separação, identificação e quantificação dos analitos, avaliou cada fluorquinolona por uma transição de massas para confirmação e outra para quantificação, pelo modo *multiple reaction monitoring* (MRM), apresentou bons resultados no que se refere à veracidade, com recuperações acima de 88,5%, à linearidade, com coeficientes de determinação superiores a 0,931, adequada precisão, para coeficientes de variação menores que 12,3%, além de baixos valores de incertezas expandidas e boa seletividade. O segundo método validado, que empregou a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução utilizando analisador do tipo *tandem ion-trap-time of flight* (HPLC-IT-TOF), identificou e quantificou nove fluorquinolonas em alta resolução e também apresentou bons resultados nos critérios de aceitação. A comparação entre os dois métodos validados não indicou diferenças significativas entre os mesmos indicando que a avaliação dos resultados apresentados aponta para o potencial de aplicação de ambos na determinação simultânea de quinolonas em matrizes de músculo e rim de frango.

Almeida *et al.* (2015) desenvolveram e validaram um método quantitativo e confirmatório para determinar a presença de multiresíduos de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina em rins de frangos de corte, bovinos, equinos e suínos por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massa sequencial (UPLC-MS/MS). O método proposto foi utilizado pelo Programa Brasileiro de Resíduos e Contaminantes para monitorar as quantidades de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina em 642 amostras (501 suínos, 89 bovinos, 28 aviários e 24 equinos), analisadas no país. Destas, 27 amostras foram positivas para tetraciclina, porém, nenhuma dessas eram de rins de frangos de corte. Aproximadamente 11% de todas as amostras positivas apresentaram concentrações acima dos LMR.

Assis *et al.* (2016) avaliaram a presença e o período de depleção de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacin e do seu metabolito ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina em amostras de músculo do peito e da coxa de frangos de corte que foram submetidos aos tratamentos com esses medicamentos na água durante um período de três dias. Os resultados demonstraram a presença de todos os resíduos dos antimicrobianos utilizados, entretanto, a presença de resíduos em concentrações superiores aos LMR dos fármacos (100  $\mu\text{g/kg}$ ) foi encontrada apenas durante o período de tratamento para a oxitetraciclina e até dois dias após a interrupção da medicação para

enrofloxacin, ciprofloxacin and sulfaquinoxaline. The authors concluded that the residues of all antimicrobials were rapidly metabolized in the muscle of the birds and that after four days of withdrawal, the levels of these residues were lower than the limit of quantification (LQ) of the method used for the analytes studied.

Silveira (2016), evaluated the presence and the depletion period of six different antimicrobials from the classes of the fluoroquinolones and the tetracyclines in the muscle of broilers using HPLC-MS/MS. The author administered, orally, chlortetracycline, doxycycline and oxitetracycline during five consecutive days and ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin for three days. For tetracyclines residues were found below the LMR (100 µg/kg) one day after the treatment for chlortetracycline, two days for oxitetracycline and three days for doxycycline. In the study of the fluoroquinolones, it was possible to detect traces of enrofloxacin up to nine days after the end of the treatment. As the residues of ciprofloxacin and norfloxacin remained below the LMR (100 µg/kg) established by the Brazilian legislation after one day of the last dose administered.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

The research of residues of antimicrobials was conducted at the School of Veterinary of UFMG (EV/UFMG) and at the National Agropecuário Laboratory of Goiás (LANAGRO/GO) of MAPA. The breeding of the birds was conducted at the Experimental Farm Prof. Hélio Barbosa (FEPHB) of EV/UFMG, located in the municipality of Igarapé, Minas Gerais. The samples obtained were stored and prepared in the Laboratory of Birds and Eggs of the Department of Technology and Inspection of Products of Animal Origin (DTIPOA) of EV/UFMG. The analyses of residues of the drugs in the muscle of broilers were conducted in the Laboratory of Residues and Contaminants (LRC) of LANAGRO/GO. The antimicrobials administered, to the broilers, were oxitetracycline, sulfaquinoxaline, enrofloxacin, and as growth promoters, tilmicosin and lincomycin.

The study was conducted in strict conformity with the recommendations of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA) of the Ministry of Science, Technology, Innovations and Communications (MCTIC). The protocol was approved by the Commission of Ethics in the Use of Animals (CEUA) of UFMG (protocol of authorization 93/2015).

#### 4.1. Criação dos animais

Foram utilizados 240 pintos de corte da linhagem Cobb, de um dia de idade. Em cada boxe foram alojados 20 animais (10 aves/m<sup>2</sup>). Os frangos de corte foram alojados em um galpão experimental convencional e distribuídos em 12 boxes de estrutura metálica com 2 m<sup>2</sup> cada. O período de criação foi de 1 a 40 dias de idade. Foram utilizados três tipos de rações de acordo com a fase de criação: inicial, de um a 21 dias de idade; crescimento, de 22 a 35 dias de idade; e terminação, de 36 a 40 dias de idade. Água e ração foram oferecidos à vontade durante todo o período de criação, sendo a ração dentro de cada fase de criação isoprotéicas e isoenergéticas.

#### 4.2. Tratamentos

Os tratamentos foram definidos de acordo com o antimicrobiano oferecido às aves:

- A) aves que receberam ração e água sem uso de medicamento (controle);
- B) aves que receberam tilosina como promotor de crescimento na ração;
- C) aves que receberam lincomicina como promotor de crescimento na ração;
- D) aves que receberam enrofloxacina, para fins terapêuticos na água;
- E) aves que receberam sulfaquinoxalina, para fins terapêuticos na água;
- F) aves que receberam oxitetraciclina, para fins terapêuticos na água.

As dosagens dos antimicrobianos usados foram calculadas com base nas indicações do fabricante, e resultaram nas concentrações de 55 g de tilosina por tonelada de ração oferecida do primeiro dia até o 35º dia de criação (tratamento B); 4,4 g de lincomicina por tonelada de ração, do primeiro dia até o 35º dia (tratamento C), e 10 mg/kg de peso vivo dos antimicrobianos enrofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, aplicados na água de beber, do 32º até o 34º dia de criação (tratamentos D, E e F). As aves do tratamento A (controle) receberam água e ração sem medicamentos, durante todo o período de criação.

### **4.3. Obtenção das amostras**

Para a avaliação da presença de resíduos de medicamentos em rim de frangos de corte, foram utilizadas seis repetições por dia de coleta e por tratamento. Para a coleta de rim, as aves do tratamento A, B e C foram abatidas nos dias 35, 36, 38 e 40, enquanto as aves do tratamento D, E e F foram abatidas nos dias 33, 34, 35, 36, 38 e 40. Os frangos de corte foram abatidos de acordo com os princípios do abate humanitário e foram adequadamente insensibilizados utilizando o método de atordoamento elétrico previamente a degola e sangria. As amostras de rins colhidas foram identificadas, congeladas e enviadas ao LRC do LANAGRO/GO para análise de resíduos utilizando uma metodologia previamente desenvolvida e validada no LRC.

### **4.4. Análise dos resíduos de antimicrobianos**

Para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em rim, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (modelo 1100/1200 Series, marca Agilent) acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 5000 (Applied Biosystems) equipado com interface ESI, operado no modo positivo. A metodologia analítica oficial utilizada (IT RSC 366) foi validada de acordo com os procedimentos descritos no Manual da Garantia da Qualidade Analítica do Laboratório (BRASIL, 2011).

#### **4.4.1. Equipamentos**

- Agitador de tubos tipo vórtex;
- Balança analítica com precisão de  $\pm 0,0001$  g;
- Capela de exaustão
- Centrífuga com capacidade para tubos de 15 mL e 4000 rpm;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo 1100/1200 Series, marca Agilent), acoplado ao detector por espectrometria de massas triplo quadrupolo (API 5000, Applied Biosystems);
- Micro-centrífuga com capacidade para tubos de 2 mL e 12000 rpm;
- Micropipeta de Repetição Digital;

- Micropipetas de volume ajustável com capacidade de 2-20  $\mu\text{L}$ ; 20 – 200  $\mu\text{L}$ ; 100 – 1000  $\mu\text{L}$ ; 1 – 5 mL e 1 – 10 mL;
- Pipeta de vidro graduada de 2 mL

#### 4.4.2. Insumos

- Coluna para HPLC de fase estacionária C18 (superfície porosa), dimensões de 50 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 2,7  $\mu\text{m}$ .
- Filtros de PTFE de 4-15 mm de diâmetro com 0,22-0,45  $\mu\text{m}$  de poro;
- Nitrogênio comercial;
- Sólido dispersivo C-18 (0,0085g)

#### 4.4.3. Reagentes e padrões

- Acetonitrila, grau HPLC;
- Ácido fórmico P.A.;
- Ácido Tricloroacético P.A.;
- Água ultra pura;
- Metanol, grau HPLC;
- Padrões de elevada pureza: hidrocloreto de oxitetraciclina, tartarato de tilosina, cloridrato de lincomicina, todos Padrão de Referência Certificados ISO Guia 34:2009, marca DR Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).
- Padrões de antibióticos enrofloxacina e sulfaquinoxalina, com pureza mínima de 98%, adquiridos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e apresentavam certificado declarando pureza e validade.
- Acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Todos os reagentes utilizados foram de grau puro para análise, exceto os solventes utilizados na cromatografia, que foram de grau LC/MM.

#### 4.4.3.1. Preparo das soluções

Os padrões foram preparados como soluções estoque e de adição, sendo que esta última continha a mistura dos analitos nas concentrações determinadas. Foi preparada também solução de Enrofloxacino-D5 (padrão interno), além de soluções reagentes.

##### 4.4.3.1.1. Solução estoque

As soluções estoque foram preparadas a partir da pesagem dos padrões de referência de cada analito, ajustando a massa de acordo com a pureza e a base livre declarada no certificado que acompanhava os padrões, a fim de se obter uma concentração de 100 µg/mL para todos os analitos. Estas soluções foram preparadas e diluídas individualmente em metanol em balões volumétricos calibrados de 100 mL. As soluções foram conservadas em *freezer* em temperatura abaixo de -18 °C, atentando-se ao prazo de validade de um ano.

##### 4.4.3.1.2. Solução padrão de adição (*Pool*)

A solução padrão de adição (*Pool*), contendo todos os analitos, foi obtida através da diluição da solução estoque de cada analito em balão volumétrico calibrado de 100 mL, sendo o volume final do balão completado com metanol e obtendo-se assim a concentração final para cada analito conforme descrito à seguir: tilosina 2 µg/mL, lincomicina 10 µg/mL, enrofloxacina 6 µg/mL, ciprofloxacina 6 µg/mL, sulfaquinoxalina 2 µg/mL, oxitetraciclina 24 µg/mL. A solução foi conservada em *freezer* em temperatura abaixo de -18 °C, atentando-se ao prazo de validade de seis meses.

##### 4.4.3.1.3. Solução padrão de calibração *Pool* para HPLC-MS/MS

A curva de calibração foi preparada pela fortificação de amostras branca com o *Pool*. As amostras de concentração controle (CC) e controle negativo (CN) utilizadas estão apresentadas na Tab 2.

**Tabela 2.** Fortificação de amostras brancas para curva de calibração com o volume de solução de adição

| <b>Concentração do <i>Pool</i></b><br><b>(%)</b> | <b>Descrição</b> | <b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|--------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------|
| 0%                                               | CN               | 0 $\mu\text{L}$                          |
| 50%                                              | CC 50            | 50 $\mu\text{L}$                         |
| 100%                                             | CC 100           | 100 $\mu\text{L}$                        |
| 150%                                             | CC 150           | 150 $\mu\text{L}$                        |
| 200%                                             | CC 200           | 200 $\mu\text{L}$                        |

#### 4.4.3.1.4. Solução de padrão interno (PI) (Enrofloxacino-D5)

A solução de PI foi preparada através da diluição da solução estoque de Enrofloxacino-D5 em balão volumétrico calibrado de 100 mL, obtendo-se uma concentração final de 6  $\mu\text{g/mL}$ . A solução foi conservada em *freezer* em temperatura abaixo de  $-18^{\circ}\text{C}$ , atentando-se ao prazo de validade de 6 meses.

#### 4.4.3.1.5. Soluções reagentes

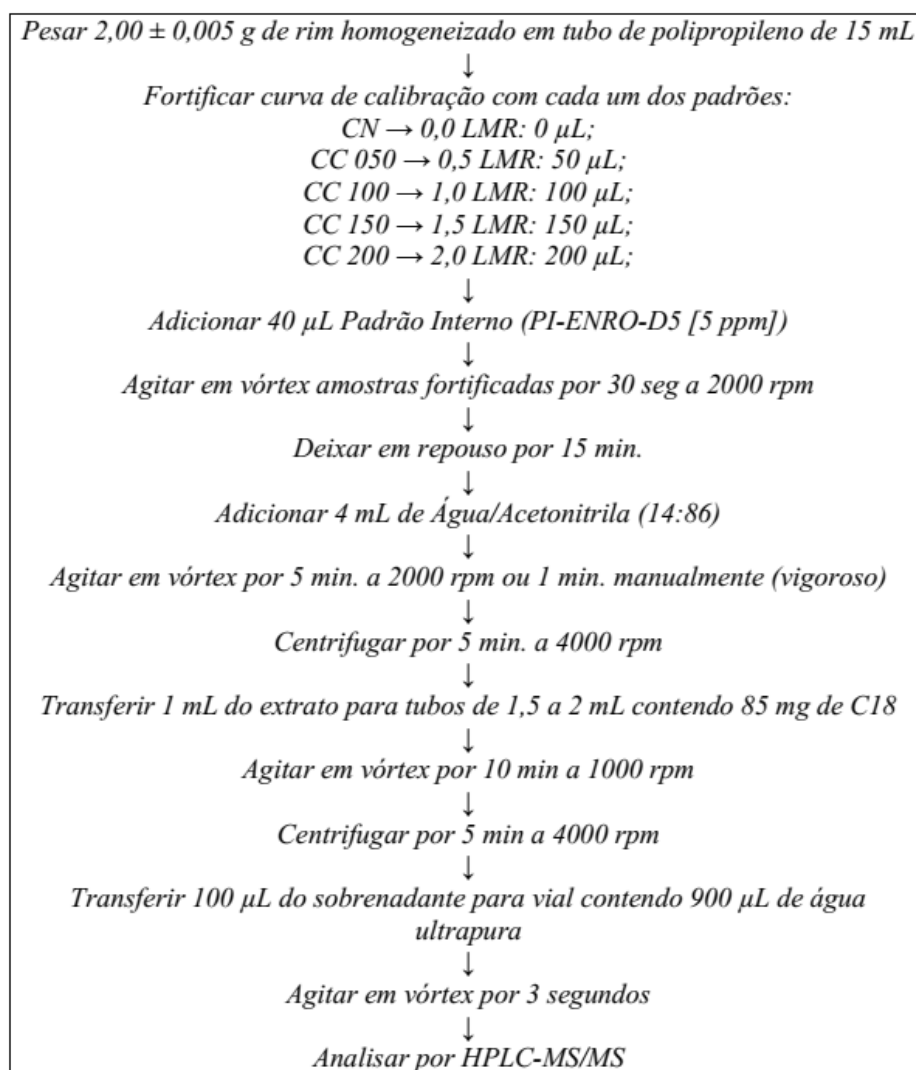
Foram preparadas as soluções reagentes para etapa de análise de tetraciclinas, macrolídeos e lincosamidas:

- Fase de extração – Água/Acetonitrila 14:86 (v/v) – Misturou-se 140 mL de água ultra pura com 860 mL de acetonitrila grau HPLC. Validade de 6 meses, em temperatura ambiente.
- Fase Móvel A – Água/Metanol 95:5 (v/v), 0,1 de ácido fórmico – Misturou-se 950 mL de água ultra pura com 50 mL de metanol. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL de ácido fórmico. Validade de 6 meses em temperatura ambiente.
- Fase Móvel B – Acetonitrila/Metanol 50:50 (v/v), 0,1 de ácido fórmico – Misturou-se 500 mL de acetonitrila com 500 mL de metanol. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL de ácido fórmico. Validade de 6 meses em temperatura ambiente.
- Solvente de lavagem – Adicionou-se 1 mL de ácido fórmico em 1000 mL de metanol. Validade de 6 meses em temperatura ambiente.
- *Seal Wash* e Solvente de Purga – Misturou-se 950 mL de água ultra pura com 50 mL de metanol. Validade de 6 meses em temperatura ambiente.

#### 4.4.4. Extração das amostras

Para realização do procedimento de extração, as amostras foram picadas utilizando *bisturi* e pesadas 2,0 gramas ( $\pm 0,1$ ) diretamente em tubos de polipropileno de 15 mL. A extração dos compostos foi realizada utilizando o método de extração EFS por água/acetonitrila 14:86 (v/v). A solução de PI foi adicionada 40  $\mu$ L em todas as amostras e nas amostras de CC e CN. Após a extração, as amostras foram injetadas e analisadas por HPLC-MS/MS para avaliação da presença dos resíduos de medicamentos. O procedimento de extração e purificação está demonstrado em forma de fluxograma na Fig 8.

**Figura 8.** Fluxograma de procedimento de extração



#### 4.4.5. Parâmetros instrumentais

Foi utilizada uma coluna para HPLC de fase estacionária C18 (superfície porosa), dimensões de 50 x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 2,7 µm para a separação cromatográfica. A temperatura da coluna foi fixada em 30°C. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar a 5,5 kV e temperatura da fonte de 650°C. Foram utilizadas as fases móveis A (Água /Metanol 95:5) e B (Acetonitrila /Metanol 50:50), em um fluxo de 0,5 a 0,6 mL/min, conforme o gradiente descrito na Tab. 3. O volume de injeção foi de 50 µL.

**Tabela 3.** Programação de gradiente da fase móvel Tetraciclina + Macrolídeos + Lincosamidas (API 5000).

| Tempo (min.) | Fase móvel |                  | Fluxo<br>(mL.min <sup>-1</sup> ) |
|--------------|------------|------------------|----------------------------------|
|              | A (%)      | Fase Móvel B (%) |                                  |
| 0,00         | 100        | 0                | 0,6                              |
| 0,10         | 100        | 0                | 0,5                              |
| 5,00         | 70         | 30               | 0,5                              |
| 9,00         | 0          | 100              | 0,5                              |
| 12,00        | 0          | 100              | 0,5                              |
| 14,00        | 0          | 100              | 0,6                              |

As condições de trabalho para o sistema cromatográfico e para o detector de massas foram estabelecidas por meio de infusões de soluções padrões dos analitos, preparadas individualmente.

Para cada analito foram monitoradas no mínimo duas transições *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), com modo de monitoramento *Scheduled* e janela de detecção de 60 segundos para o período de MRM 1 e 180 segundos para o período de MRM 2. A primeira transição foi utilizada para a identificação e a segunda para confirmação. O potencial de entrada (EP) foi de 10.00 volts. Nitrogênio foi usado como gás de colisão (CAD) e de dessolvatação (CUR) às pressões de 6,0 e 15,0 psi, respectivamente. Ar sintético ultrapuro foi empregado como gás nebulizante (GS1) e como gás secante aquecido (GS2) à pressão de 55 psi. Os parâmetros de operação do espectrômetro de massas API5000 podem ser resumidos na Tab 4.

**Tabela 4.** Parâmetros de operação do espectrômetro de massas API 5000.

| Parâmetros            | Valores               |
|-----------------------|-----------------------|
| CAD                   | 6                     |
| CUR                   | 15                    |
| GAS 1                 | 55                    |
| GAS 2                 | 55                    |
| IS                    | 5500                  |
| TEM                   | 550                   |
| EP                    | 10.00                 |
| CXP                   | 15.00                 |
| Modo de monitoramento | Scheduled             |
| Período MRM 1         | Janela (seg.) 60      |
|                       | T. de Scan (seg.) 0,5 |
| Período MRM 2         | Janela (seg.) 180     |
|                       | T. de Scan (seg.) 0,2 |

Os fragmentos monitorados no modo MRM para o íon precursor e íons produto, o potencial de desagregação (DP), a energia de colisão (CE), o potencial de saída da célula de colisão (CXP) e o tempo de retenção para cada transição estão apresentados na Tab 5.

**Tabela 5.** Transições MRM e tempo de retenção dos analitos pesquisados

| Analito            | Q1     | Q3    | DP (v) | CE (v) | Tempo de Retenção (min) |
|--------------------|--------|-------|--------|--------|-------------------------|
| Lincomicina 1      | 407,2  | 126,2 | 75     | 41     | 6,4                     |
| Lincomicina 2      |        | 359,3 |        | 26     |                         |
| Tilosina 1         | 916,65 | 174,3 | 80     | 55     | 9,8                     |
| Tilosina 2         |        | 772,5 |        | 40     |                         |
| Oxitetraciclina 1  | 461,2  | 426,2 | 30     | 28     | 7,4                     |
| Oxitetraciclina 2  |        | 443,3 |        | 18     |                         |
| Enrofloxacino-D5 1 | 365,2  | 321,2 | 40     | 30     | 7,8                     |
| Enrofloxacino-D5 2 |        | 347,2 |        | 33     |                         |
| Enrofloxacino 1    | 360,2  | 316   | 45     | 30     | 7,8                     |
| Enrofloxacino 2    |        | 245   |        | 40     |                         |
| Ciprofloxacino 1   | 332,1  | 314   | 35     | 50     | 8,6                     |
| Ciprofloxacino 2   |        | 231   |        | 31     |                         |
| Sulfaquinoxalina 1 | 301,1  | 156,1 | 35     | 25     | 9,3                     |
| Sulfaquinoxalina 2 |        | 92    |        | 43     |                         |

#### 4.4.6. Análise dos dados obtidos

Os resultados da pesquisa foram avaliados de acordo com a metodologia oficial validada, conforme descrito abaixo:

- Analitos considerados não detectados (ND): Amostras cuja concentração encontrada nos resultados for abaixo de  $0,1 \times \text{LMR}$ .
- Analitos considerados não quantificados e somente detectados (LD): Amostras cuja concentração encontrada nos resultados estiver entre  $0,1 \times \text{LMR}$  e  $0,5 \times \text{LMR}$ .
- Analitos considerados detectados e quantificados (LQ): Amostras cuja concentração encontrada nos resultados estiver acima de  $0,5 \times \text{LMR}$ .

#### 4.5. Delineamento experimental

Para as avaliações de resíduos de medicamentos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, sendo as parcelas constituídas pelos seis tratamentos e as subparcelas constituídas pelos dias de avaliação com seis repetições cada. Os níveis dos resíduos dos antimicrobianos foram submetidos a análise não paramétrica e as medianas foram comparadas usando o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância 5%.

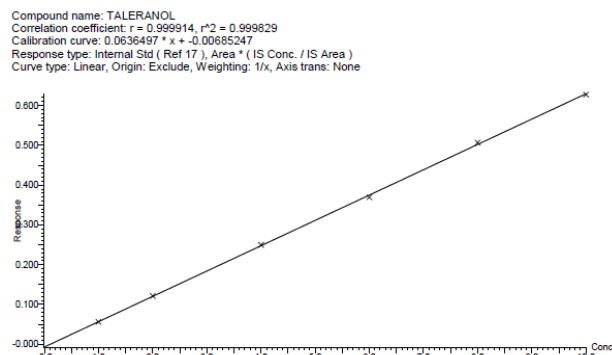
### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Curvas de calibração dos antimicrobianos utilizados

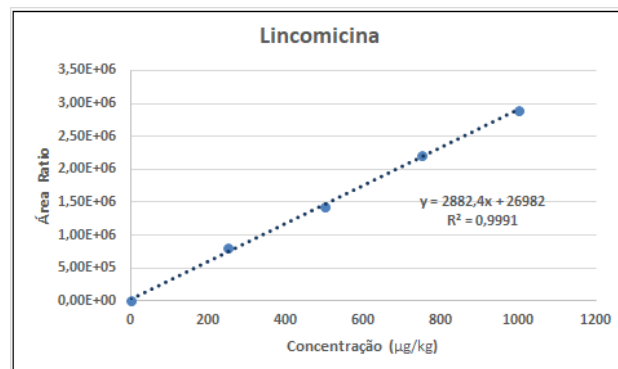
As curvas de calibração, o coeficiente de correlação ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das análises de matriz branca fortificada, obtidas na avaliação da linearidade, estão representadas na Fig. 9. De acordo com os resultados observados, pôde-se concluir que o modelo foi adequado, pois o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi superior a 0,97, indicando um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani *et al.*, 2004).

**Figura 9.** Curvas de regressão dos antimicrobianos tilosina (A), lincomicina (B), enrofloxacin (C), sulfaquinoxalina (D) e oxitetraciclina (E), adicionados às amostras brancas de rim de frango de corte, na faixa de 5 a 200 µg/kg

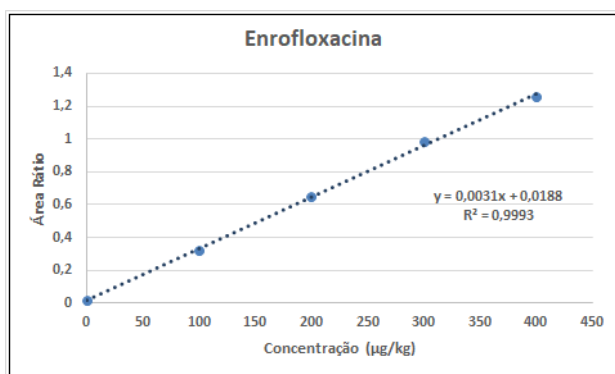
Tilosina (A)



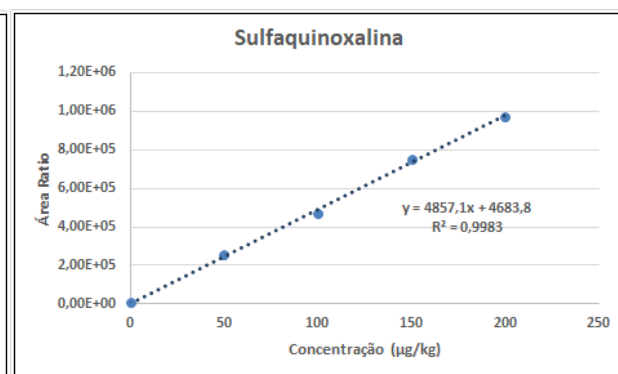
Lincomicina (B)



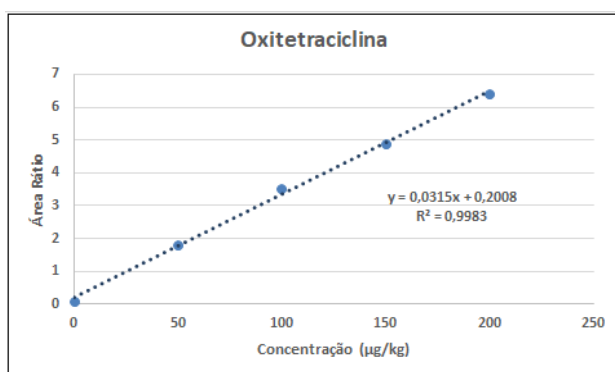
Enrofloxacin (C)



Sulfaquinoxalina (D)



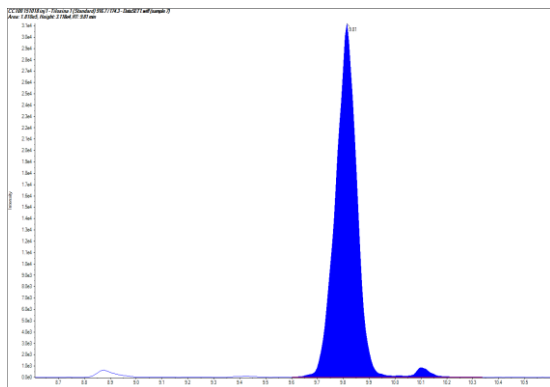
Oxitetraciclina (E)



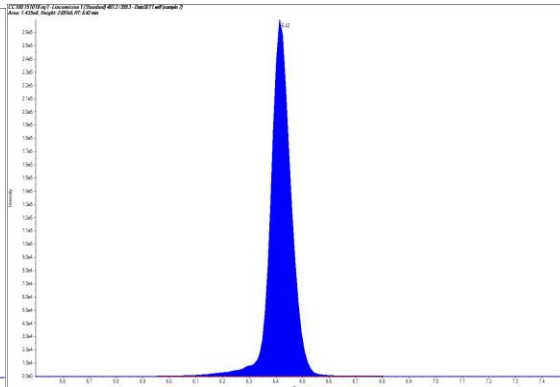
Os cromatogramas do controle positivo 100 % x LMR (CC 100) para os analitos pesquisados, além do padrão interno estão ilustrados na Fig 10.

**Figura 10.** Cromatogramas dos analitos (padrões) tilosina (A), lincomicina (B), enrofloxacin (C), sulfaquinoxalina (D) e oxitetraciclina (E) recuperados no controle positivo 100% x LMR (CC 100) e do padrão interno ENRO D5 (F).

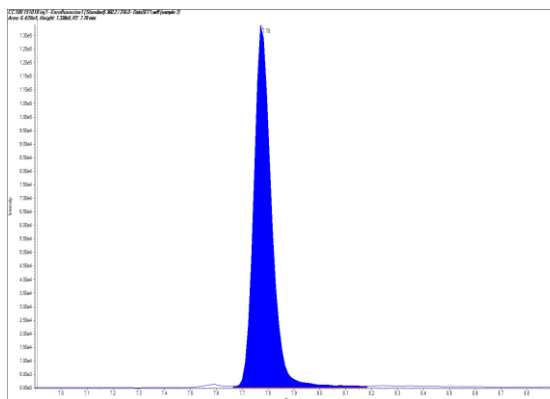
Tilosina (A)



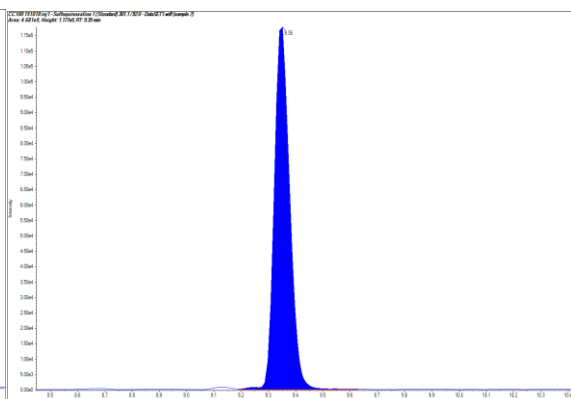
Lincomicina (B)



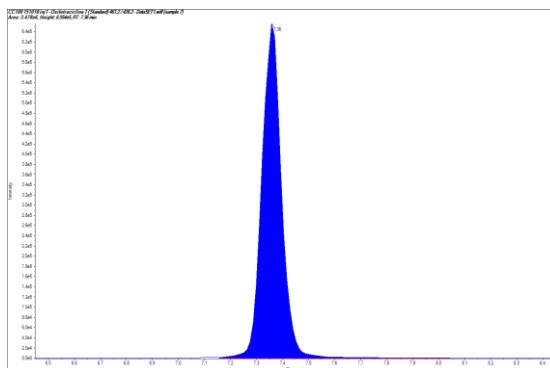
Enrofloxacin (C)



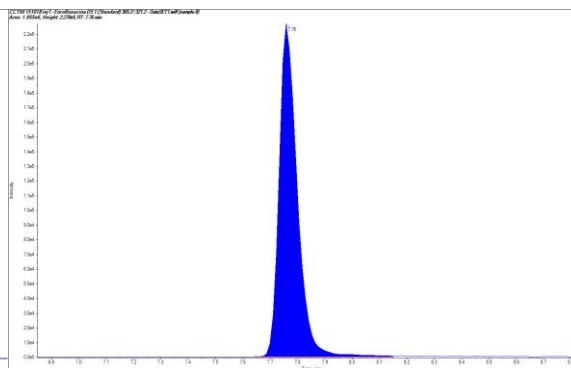
Sulfaquinoxalina (D)



Oxitetraciclina (E)



Padrão Interno - ENRO-D5 (F)



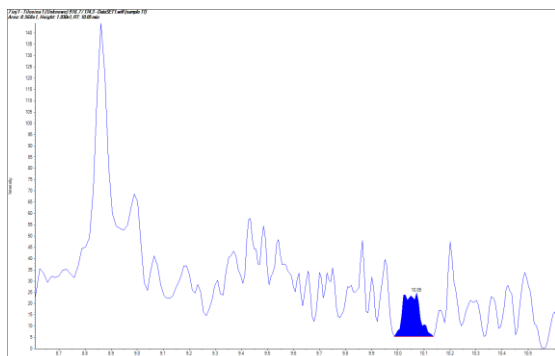
## **5.2. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em rim de frangos de corte**

### **5.2.1. Grupo controle**

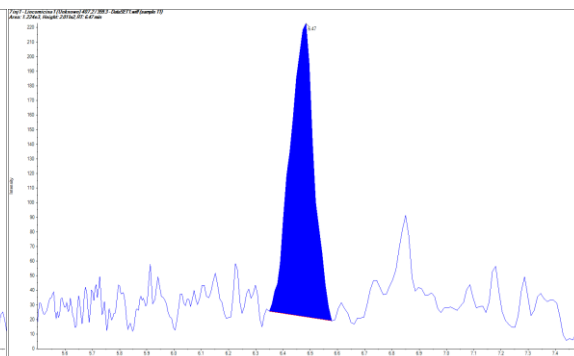
Os resultados das análises da pesquisa de resíduos de antimicrobianos em rim de frangos de corte demonstraram que, nas amostras do grupo controle, não foram detectados resíduos de nenhum dos medicamentos utilizados no tratamento das aves, indicando que não houve contaminação durante etapas de fabricação da ração, da diluição dos medicamentos na água de beber ou do tratamento das aves. Os resultados das análises das amostras do grupo controle estão ilustrados na Fig 11. A partir das análises dos cromatogramas gerados não foram detectados picos cromatográficos nos tempos de retenção correspondentes às duas transições monitoradas. O método de HPLC-MS/MS validado foi considerado um método confirmatório para a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários, por avaliar, além do tempo de retenção dos analitos de interesse, a relação massa carga de fragmentos específicos das substâncias a serem analisadas. Para que a amostra seja considerada positiva, devem ser detectadas pelo menos duas transições do analito de interesse, o que não foi observado nos cromatogramas avaliados.

**Figura 11.** Cromatogramas da pesquisa de resíduos dos antimicrobianos tilosina (A), lincomicina (B), enrofloxacinina (C), ciprofloxacina (D), sulfaquinoxalina (E) e oxitetraciclina (F) em amostra de rim de frango de corte do grupo controle.

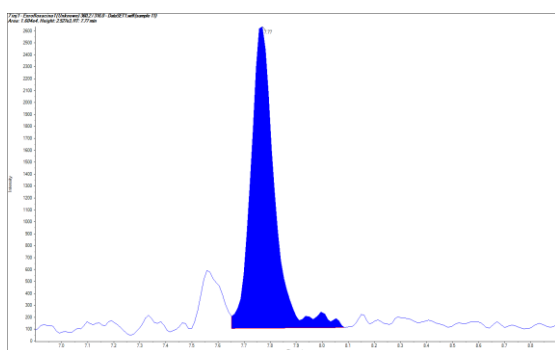
Tilosina (A)



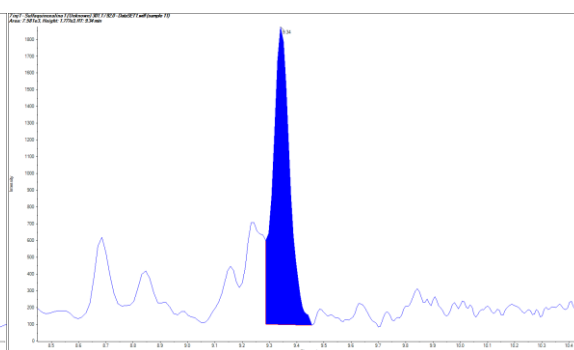
Lincomicina (B)



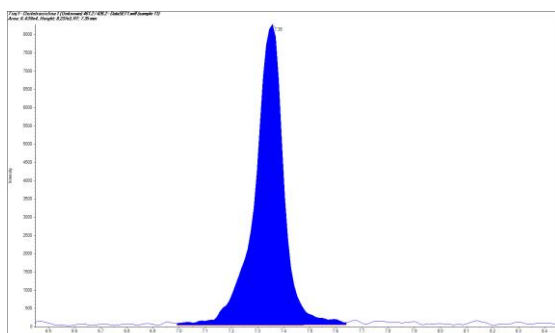
Enrofloxacinina (C)



Sulfaquinoxalina (D)



Oxitetraciclina (F)



### 5.2.2. Tilosina e lincomicina

Os resultados das análises de resíduos dos antimicrobianos tilosina (Fig. 12) e lincomicina (Fig. 13) em rim de frangos de corte não permitiram que os analitos fossem detectados nas amostras, já que todos os sinais estiveram abaixo do LD, para todos os dias de abate dos animais. O método validado para a pesquisa de ambos os analitos só permite um limite de detecção acima de 10% do LRM, o que não foi o caso das amostras

para nenhum dos dias de tratamento, para ambos os analitos. Quando comparados ao sinal do controle positivo 100% x LMR (CC 100), as amostras de ambos os tratamentos apresentaram sinal 100x menor que o LMR.

**Figura 12.** Cromatograma da análise de amostra de rim em frangos de corte tratados com tilosina na ração de consumo, coletada no 35º dia de criação

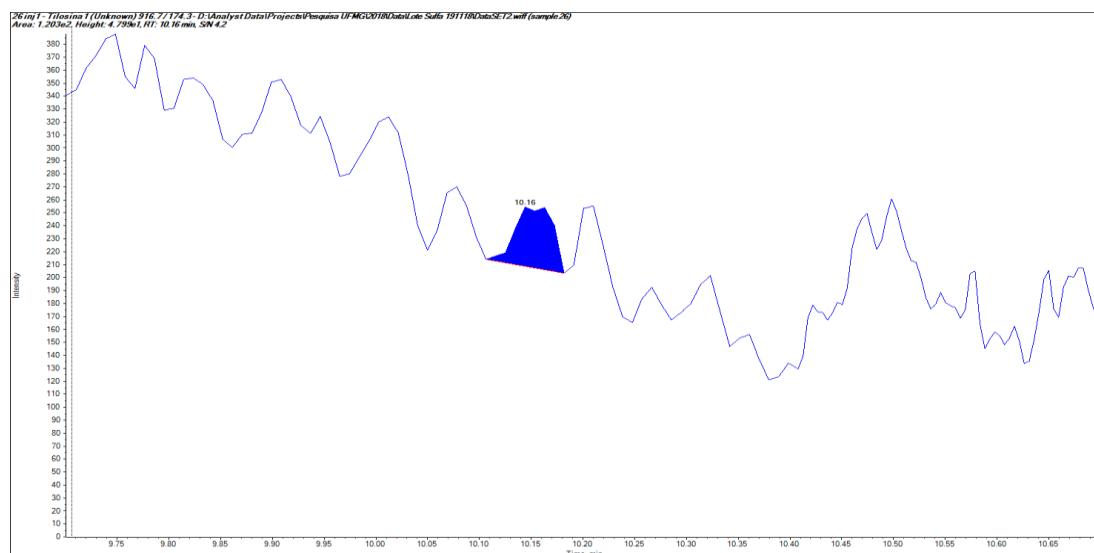
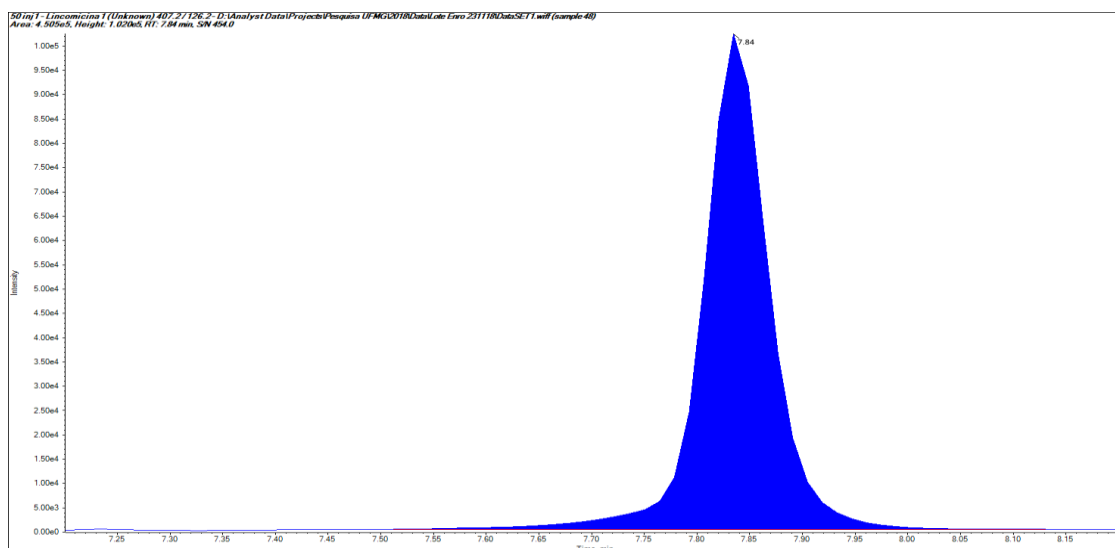


**Figura 13.** Cromatograma da análise de amostra de rim em frangos de corte tratados com lincomicina na ração de consumo, coletada no 35º dia de criação



Tilosina e lincomicina são antimicrobianos utilizados em avicultura de corte como promotores de crescimento sendo fornecidos em doses sub terapêuticas na ração de consumo dos animais com o objetivo de selecionar uma microbiota benéfica no trato gastrointestinal e consequentemente melhorar a absorção do alimento, a conversão

alimentar e o ganho de peso das aves. Segundo Palermo-Neto *et al* (2011), ambos os medicamentos têm como mecanismo de ação a ligação à porção 50 S do ribossomo inibindo assim a síntese proteica bacteriana dos microrganismos patogênicos.

A tilosina, assim como os demais macrolídeos, tem a sua biotransformação feita por enzimas microsossomais hepáticas e a eliminação via bile e fezes, o que justifica a não detecção dos seus analitos na matriz rim das aves (Spinosa *et al.* 2002). Ainda assim, a pesquisa por este analito em rim de aves de corte faz parte do plano de amostragem do subprograma de monitoramento do PNCRC com LMR igual a 100 µg/kg, valor este semelhante ao do Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia (EC, 2009; BRASIL, 2018a).

A lincomicina, assim como as demais lincosamidas, apresentam ampla solubilidade e, portanto, grande volume de distribuição e são metabolizadas principalmente pelo tecido hepático, sendo parte eliminada na forma ativa pela urina (Palermo-Neto *et al*, 2011). Semelhante a tilosina, a pesquisa pelo analito lincomicina em rim de aves de corte também faz parte do plano de amostragem do subprograma de monitoramento do PNCRC com LMR igual a 500 µg/kg, valor este inferior ao Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia (1500 µg/kg) (EC, 2009; BRASIL, 2018a).

### **5.2.3. Enrofloxacin**

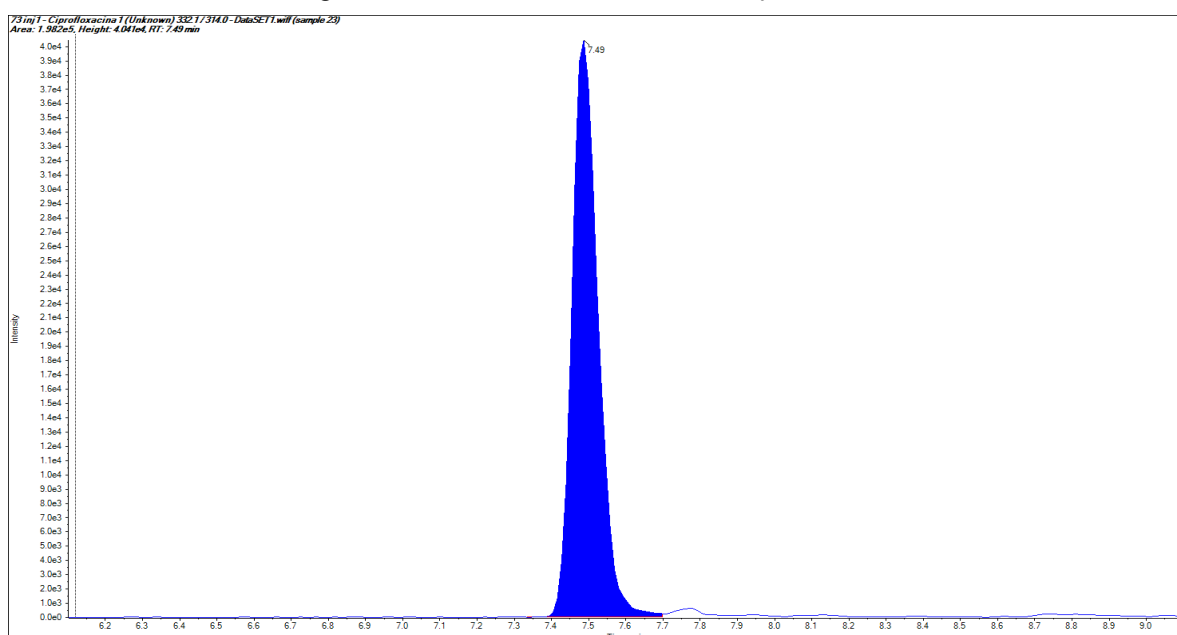
No grupo de animais tratados com enrofloxacin, as maiores concentrações ( $P < 0,05$ ) de resíduos deste medicamento foram detectadas durante os dias de tratamento e até dois dias após o termino deste (Tab. 6). A Fig. 14 exemplifica o resultado da análise de uma amostra do grupo de animais tratados com este medicamento, coletada no 33º dia de criação. Foram observados picos cromatográficos com alta intensidade de sinal para o analito enrofloxacin.

**Tabela 6.** Mediana, máximos e mínimos das concentrações de resíduos do antimicrobiano enrofloxacin analisado pelo método validado de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual

| Dia de tratamento | Enrofloxacin ( $\mu\text{g/kg}$ ) |         |        |
|-------------------|-----------------------------------|---------|--------|
|                   | Mediana                           | Máximo  | Mínimo |
| 33                | 8025,5 b                          | 12920,0 | 6745,8 |
| 34                | 8757,2 b                          | 12542,1 | 7628,9 |
| 35                | 4924,4 b                          | 7091,8  | 3931,1 |
| 36                | 409,8 b                           | 983,2   | 5,0    |
| 38                | 69,1 a                            | 116,7   | 45,1   |
| 40                | 25,2 a                            | 40,0    | 19,6   |

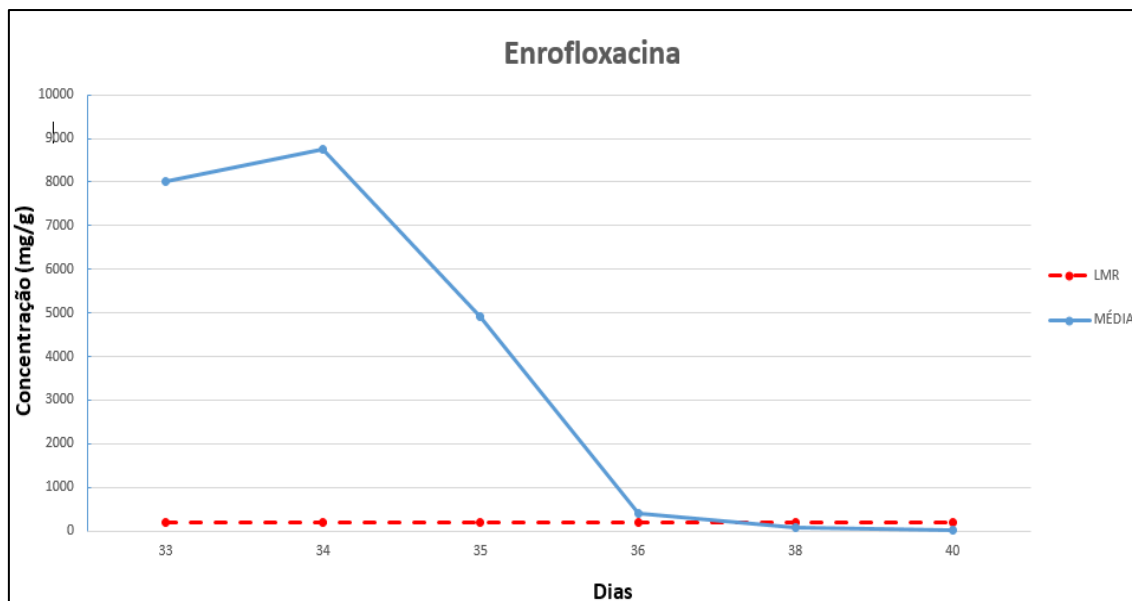
Medianas seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

**Figura 14.** Cromatograma da análise de amostra de rim em frangos de corte tratados com enrofloxacin na água de beber, coletada no 33º dia de criação



Após o início da administração do medicamento via água de beber, no 33º dia de criação das aves, foi observada alta concentração de resíduos de enrofloxacin nos rins dos frangos de corte (Fig. 15). O tratamento das aves foi interrompido no 34º dia de criação e as concentrações declinaram rapidamente após o segundo dia que foi finalizado o tratamento.

**Figura 15.** Concentrações medianas de resíduos do antimicrobiano enrofloxacinina analisado pelo método de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual



A pesquisa pelo analito enrofloxacinina (assim como o seu metabólito, a ciprofloxacina) em rim de aves de corte não faz parte do plano de amostragem do PNCR, diferente do Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia cuja pesquisa pelo analito possui valores de LMR somados de 300 µg/Kg. Dessa forma, pelo Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia, as concentrações encontradas nos 2 dias de tratamento analisados com o medicamento (33º e 34º dias) e nos 2 dias seguintes à finalização do tratamento (35º e 36º dias) foram superiores ao LMR pesquisado para este analito (EC, 2009; BRASIL, 2018a).

A enrofloxacinina é um antimicrobiano sintético da classe das quinolonas de emprego exclusivo na medicina veterinária, sendo considerada eficaz e segura em terapias combinadas com outros medicamentos (Palermo-Neto *et al.*, 2011). Após a administração, este composto é metabolizado e perde um grupo etila *in vivo* formando a ciprofloxacina. A enrofloxacinina é estruturalmente semelhante a seu metabólito, a ciprofloxacina, porém a farmacocinética da ciprofloxacina é diferente e sua biodisponibilidade é menor no organismo da ave quando comparada à enrofloxacinina (Ito *et al.*, 2005). Apesar de a enrofloxacinina ser utilizada apenas em medicina veterinária, é importante destacar que a ciprofloxacina é um antimicrobiano farmacologicamente ativo que, além de ser utilizado em medicina veterinária, é também empregado na medicina humana (Garcia-Ovando *et al.*, 1999; Assis *et al.*, 2016).

Após a administração das quinolonas observa-se rápida absorção pelo trato gastrointestinal e, dependendo da espécie animal, a biodisponibilidade pode variar de 30 a 90% de princípio ativo (Palermo-Neto *et al.*, 2011). Segundo estes autores, estes fármacos acumulam-se pouco nos tecidos, justificando o curto período de retirada para o abate dos frangos de corte. Devido ao seu amplo espectro de ação, a enrofloxacin é utilizada na avicultura comercial para o tratamento de infecções por *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, coriza infecciosa das galinhas, infecções por *Ornithobacterium rhinotracheale*, celulite por Gram-negativos, estafilococose, salmoneloses, dentre outras infecções (Ito *et al.*, 2005). Dessa forma, por ser um medicamento amplamente utilizado na avicultura comercial exige-se muita atenção tais como falhas de manejo, como dosagem inadequada ou o não cumprimento do período de retirada indicado pelo fabricante.

O uso de enrofloxacin para animais de produção é proibido nos Estados Unidos. Com a suspensão da aprovação pelo *FDA* de uso da enrofloxacin em frangos de corte no ano de 2005, com a justificativa de que a utilização de fluorquinolonas nas aves pode levar ao desenvolvimento de *Campylobacter* spp. resistentes a estes antimicrobianos e, conseqüentemente, ao aumento do número de infecções por estes micro-organismos resistentes em seres humanos (Goetting *et al.*, 2011; *FDA*, 2015; Landoni e Albarellos, 2015).

Segundo Landoni e Albarellos (2015), o período de retirada da enrofloxacin varia de três a sete dias para frangos de corte. O período de carência indicado pelo fabricante do produto comercial à base de enrofloxacin utilizado no presente trabalho é de dez dias. No entanto, concentrações de resíduos destes medicamentos acima do LMR, foram encontradas nas amostras de rim somente até o 36º dia de criação das aves, ou seja, dois dias após o término do tratamento.

Um estudo conduzido por Amjad *et al.* (2004) estimou e comparou as concentrações de resíduos de quinolonas (ácido oxolônico, flumequina, enrofloxacin e ciprofloxacina) em aves de produção incluindo as matrizes músculo, rim, fígado e ovos. A avaliação da variação de cada analito nestes produtos foi feita empregando HPLC-MS/MS. Neste estudo, o analito enrofloxacin foi encontrado em maior concentração dentre as 4 quinolonas pesquisadas, seguida, em ordem, por ciprofloxacina, flumequina e ácido oxolônico. Na comparação por na matriz pesquisada para o analito enrofloxacin, a concentração foi maior em rim, seguida, em ordem, pela matriz fígado, ovos e músculo.

O estudo e a definição do correto período de retirada dos antimicrobianos utilizados para tratamento dos frangos de corte tem impacto econômico e também na adequação do manejo, principalmente nas fases finais de criação. O estabelecimento de períodos de retirada, baseado em estudos científicos de depleção das drogas e na segurança da utilização desses medicamentos, possibilita o tratamento adequado dos animais e o envio para o abate de lotes tratados que obedeceram o período necessário para a eliminação do medicamento e de seus resíduos do organismo do animal (Assis *et al.*, 2016).

#### 5.2.4. Sulfaquinoxalina

No grupo de animais tratados com sulfaquinoxalina na água de beber, as maiores concentrações ( $P < 0,05$ ) de resíduos deste medicamento foram detectadas durante os dias de tratamento e até três dias após o término deste (Tab. 7) indicando que após a retirada do medicamento, as concentrações de resíduos nos rins dos frangos de corte declinaram até o quarto dia pós retirada da medicação, o último dia de abate (40º dia).

**Tabela 7.** Mediana, máximos e mínimos das concentrações de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisado pelo método validado de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual

| Dia de tratamento | Sulfaquinoxalina ( $\mu\text{g/Kg}$ ) |         |         |
|-------------------|---------------------------------------|---------|---------|
|                   | Mediana                               | Máximo  | Mínimo  |
| 33                | 21550,8 b                             | 25251,3 | 19725,6 |
| 34                | 27869,0 b                             | 32662,9 | 21299,7 |
| 35                | 28089,6 b                             | 39249,5 | 18092,7 |
| 36                | 8810,7 b                              | 14092,7 | 5162,2  |
| 38                | 214,3 b                               | 1060,7  | 113,0   |
| 40                | 51,4 a                                | 103,1   | 34,8    |

Medianas seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

O cromatograma representado na Fig 16 ilustra o resultado da análise de uma amostra de rim coletada no dia 33, pertencente ao grupo no qual os animais receberam sulfaquinoxalina. A quantificação dos analitos baseia-se na relação entre área do pico e

concentração e a presença de um pico com alta intensidade de sinal ilustra os teores de sulfaquinoxalina encontrados neste dia de análise. A concentração de resíduos de sulfaquinoxalina nos rins dos frangos de corte encontra-se na Fig 17.

**Figura 16.** Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com sulfaquinoxalina na água de beber, coletada no 33º dia de criação

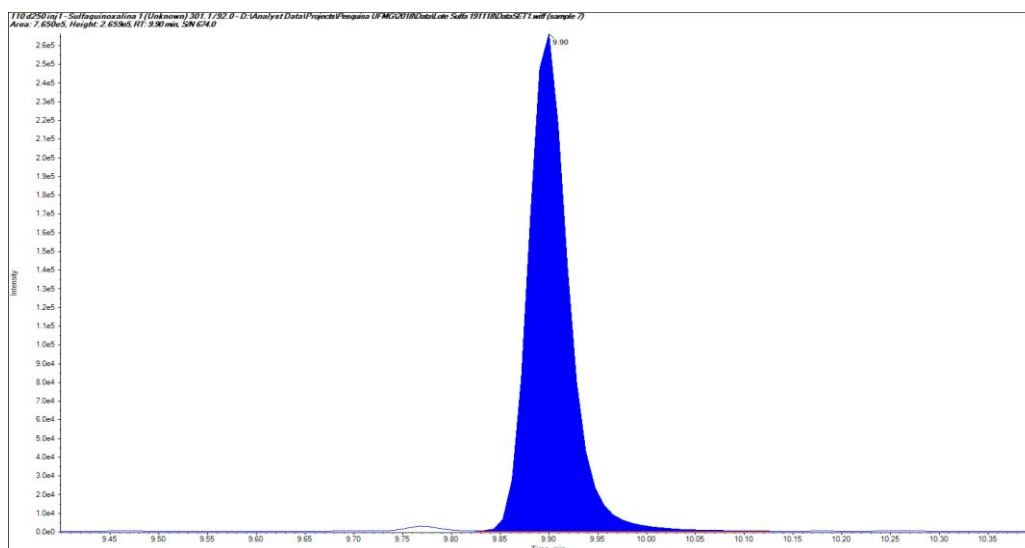
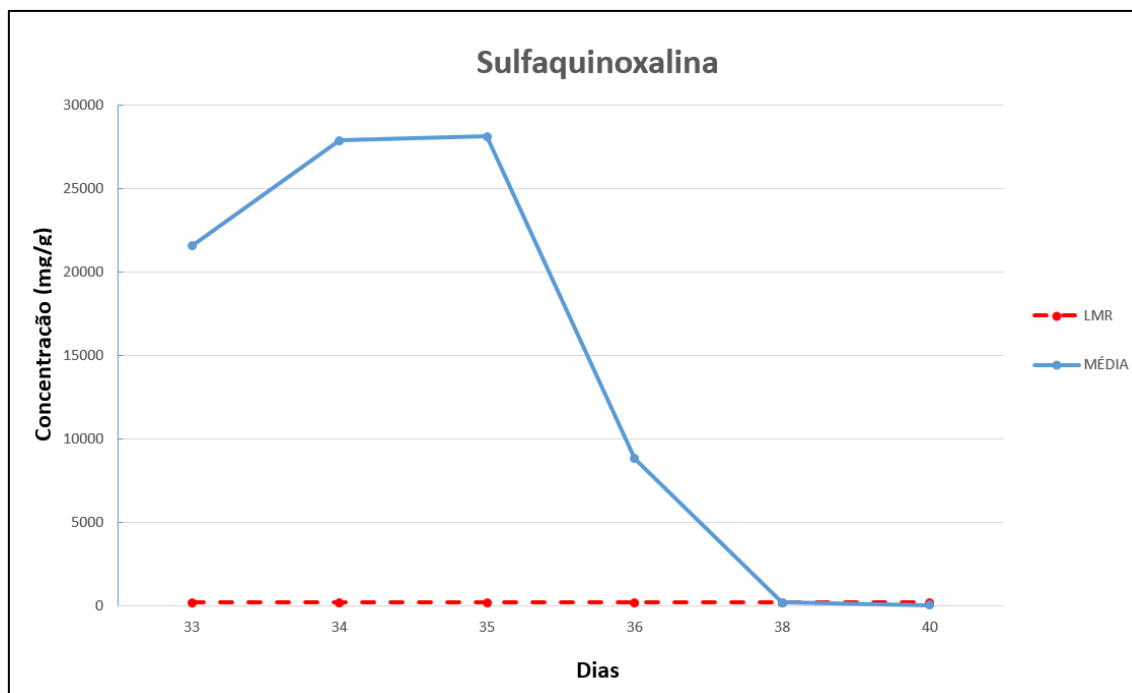


**Figura 17.** Concentrações medianas de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual



A pesquisa de sulfonamidas em rim de aves não faz parte do plano de amostragem do subprograma de monitoramento do PNCRC, sendo pesquisado, neste subprograma, analitos na matriz músculo. Por outro lado, o Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia indica a pesquisa de sulfonaminas em rim de aves somadas na concentração de 100 µg/kg (EC, 2009; BRASIL, 2018a).

Esta classe tem sido extensivamente utilizada como agentes terapêuticos, principalmente para o controle da coccidiose, pulorose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas sendo bactericidas ou bacteriostáticas, dependendo da dose de administração (Górniak, 2011). Segundo Palermo-Neto, (2011), após a administração via oral, as sulfonamidas são absorvidas pelo trato gastrintestinal e biotransformadas no fígado, principalmente por acetilação e oxidação, e a eliminação se faz pelas fezes ou por via renal na urina na forma ativa, ou como metabólito por filtração glomerular.

Segundo Landoni e Albarellos (2015), o hábito de coprofagia dos frangos de corte pode aumentar o tempo de permanência da droga no organismo animal e, por este motivo, é indicado o cumprimento do período de carência mínimo de 10 dias. O fabricante do produto comercial utilizado no presente trabalho também recomenda o período de retirada de dez dias. No entanto, no presente trabalho, este longo período de permanência da droga no organismo do animal não foi observado, pois no quarto dia após o término do tratamento, as concentrações encontradas foram inferiores ao LMR recomendado pelo Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia

Apesar da sulfaquinoxalina, ser amplamente utilizada na avicultura industrial, ao avaliar os resultados do monitoramento divulgados pelo Brasil para o ano de 2017, foi encontrada apenas uma amostra de músculo de ave violada, na concentração de 160,47 µg/kg (BRASIL, 2017).

#### **5.2.5. Oxitetraciclina**

Os resultados das análises do analito oxitetraciclina em rins de frangos de corte que receberam este medicamento na água de beber encontram-se descritos na Tab 8.

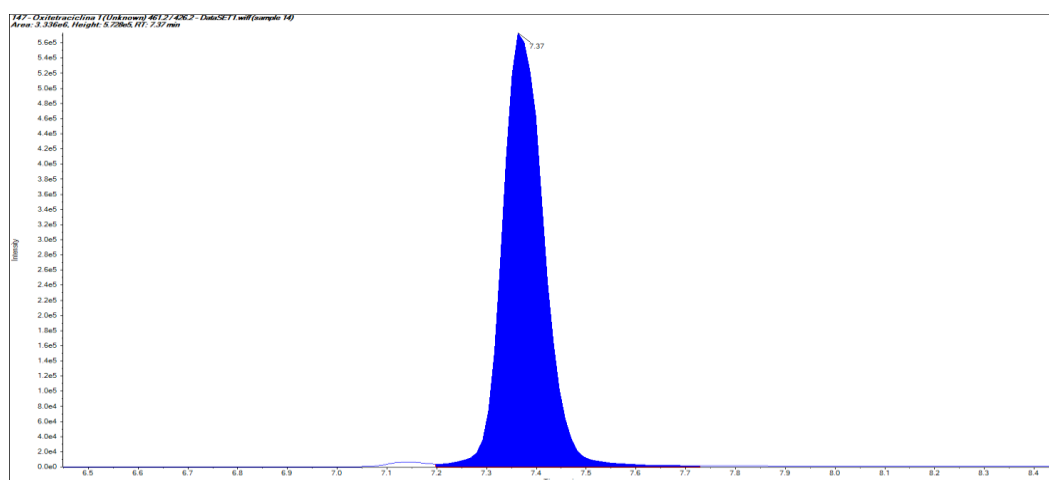
**Tabela 8.** Mediana, máximos e mínimos das concentrações de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados pelo método validado de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual

| Dia de tratamento | Oxitetraciclina (µg/Kg) |        |        |
|-------------------|-------------------------|--------|--------|
|                   | Mediana                 | Máximo | Mínimo |
| 33                | 993,0 b                 | 1378,8 | 692,2  |
| 34                | 1241,2 b                | 1507,8 | 526,4  |
| 35                | 1066,9 b                | 1227,1 | 726,6  |
| 36                | 554,2 b                 | 685,8  | 329,4  |
| 38                | 111,6 a                 | 138,9  | 10,6   |
| 40                | 94,2 a                  | 116,5  | < 0    |

Medianas seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

As concentrações de resíduos de oxitetraciclina encontradas estão demonstradas no cromatograma representado na Fig 18, que ilustra a análise de uma amostra de rim de frangos de corte tratados com oxitetraciclina, coletada no 33º dia de criação. O cromatograma da análise desta amostra apresentou menor área do pico quando comparado aos cromatogramas das análises de amostras obtidas a partir dos animais tratados com enrofloxacina e sulfaquinoxalina.

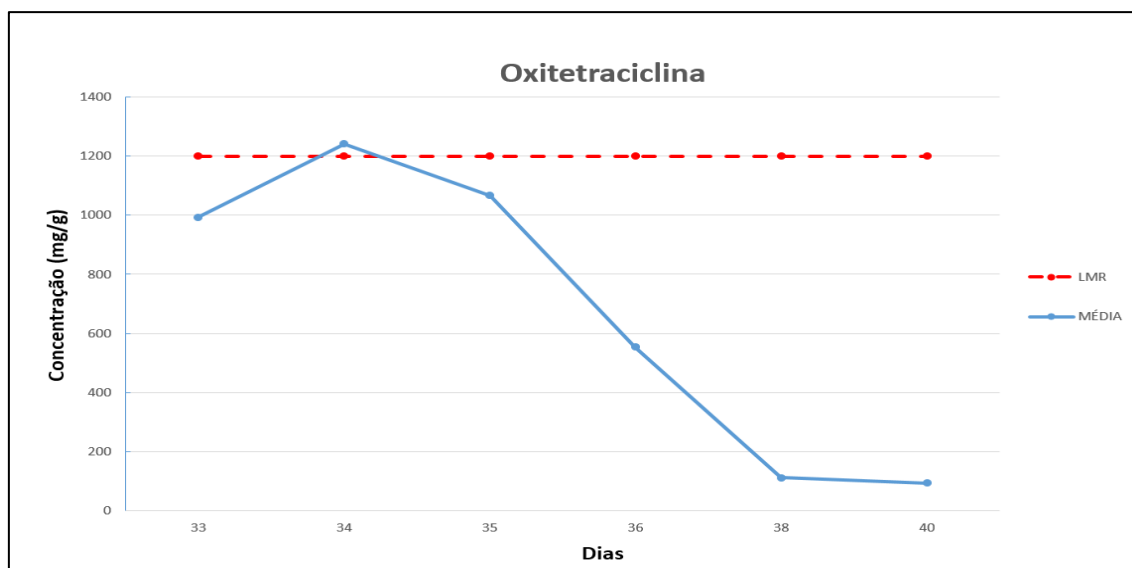
**Figura 18.** Cromatograma da análise de amostra de rim de frangos de corte tratados com oxitetraciclina na água de beber, coletada no 33º dia de criação



As maiores concentrações de resíduos de oxitetraciclina ( $P < 0,05$ ) foram observadas durante os dois últimos dias de tratamento (dias 33º e 34º) e nos dois dias seguintes (dias 35º e 36º), sendo que apenas no 34º dia a concentração média ultrapassou,

ainda que ligeiramente, o LRM definido pelo subprograma de monitoramento do PNCRC (1200 µg/Kg) (Fig. 19). No grupo de animais tratados com este medicamento, as concentrações de resíduos encontradas no rim foram baixas quando comparadas aos teores observados nos tratamentos que receberam enrofloxacina e sulfaquinoxalina.

**Figura 19.** Concentrações medianas de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz rim de frangos de corte, durante o período de tratamento e de avaliação residual



O LMR determinado pelo PNCRC para a oxitetraciclina na matriz rim de ave é de 1200 µg/kg, valor superior ao estabelecido pela Comunidade Europeia, de 600 µg/kg. Segundo os valores estabelecidos pelo PNCRC, as amostras analisadas não seriam consideradas conformes apenas durante o 34º dia de tratamento. Porém, pelo Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia, apenas a partir do 36º dia as amostras estariam dentro do limite estabelecido. (EC, 2009; BRASIL, 2018a).

Segundo Landoni e Albarellos (2015), o período de retirada da oxitetraciclina é de sete dias e, de acordo com o fabricante do produto comercial utilizado para o tratamento das aves no presente trabalho, deve ser respeitado o período de carência de cinco dias. Isso se justifica porque a oxitetraciclina é a menos lipofílica do grupo das tetraciclina, e, portanto, a que possui menor taxa de absorção após a administração via oral (Ito *et al.*, 2005; Goetting *et al.*, 2011; Spinosa e Tárraga, 2011), o que pode justificar os resultados encontrados.

Apesar da oxitetraciclina ser amplamente utilizada na avicultura industrial, ao avaliar os resultados do monitoramento divulgados pelo Brasil para o ano de 2017, não foi encontrada nenhuma amostra de rim de ave violada (BRASIL, 2017).

O estabelecimento de LMR para alimentos, pelas agências regulatórias e órgãos nacionais de diversos países é importante para garantir a segurança do consumidor assim como a regulamentação do comércio internacional. A definição dos LMR deve levar em consideração a IDA, que é a quantidade máxima de uma substância, expressa em mg/kg de peso corporal, que pode ser ingerida diariamente na alimentação, durante toda a vida, sem oferecer riscos apreciáveis à saúde, à luz dos conhecimentos toxicológicos disponíveis na época de avaliação. A IDA, determinada para cada ingrediente ativo, é estabelecida com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos medicamentos veterinários, conduzidos em animais de laboratórios e realizados em procedimentos reconhecidos em nível internacional (Jardim *et al.*, 2009.)

Segundo Palermo-Neto *et al.* (2011) animais menores, como por exemplo as aves, necessitam de maiores doses por unidade de peso corporal quando comparadas a outros animais, devido a alta taxa de metabolização destes animais. Dessa maneira, os resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobianos no rim de frangos de corte tratados com o medicamento na água de beber, podem ser justificados pela alta taxa de metabolismo destes animais, o que reflete nos mecanismos farmacocinéticos das drogas, tais como a absorção, biodisponibilidade, distribuição, biotransformação e excreção.

## 6. CONCLUSÃO

A avaliação da presença de resíduos de enrofloxacina, sulfaquinoxalina, oxitetraciclina, lincomicina e tilosina durante o período de fornecimento da droga e por até seis dias após a interrupção do tratamento permitiu concluir que:

- Os antimicrobianos enrofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, quando utilizados com fins de tratamento na fase de criação de frangos de corte, são capazes de gerar resíduos no rim desses animais.
- Concentrações de resíduos de enrofloxacina e sulfaquinoxalina, acima dos LMR no rim de frangos de corte, podem ser detectadas em até dois e três dias após o término da medicação, sendo necessários aproximadamente três a quatro dias de período de retirada dos animais para o abate. Resíduos de oxitetraciclina acima do

LMR fixado para essa droga são detectados apenas durante o tratamento das aves tratadas.

- Os antimicrobianos enrofloxacin, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina são rapidamente metabolizados pelo organismo dos frangos de corte, quatro dias após o período de retirada desses medicamentos, as concentrações encontradas no rim foram inferiores ao limite de quantificação do método utilizado.
- Resíduos dos antimicrobianos lincomicina e tilosina, utilizados como promotores de crescimentos, não são detectados no rim dos frangos de corte tratados com esses medicamentos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatórios Anuais*. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>> Acesso em: 28 de novembro de 2018.

AMJAD, H.; IQBAL, J. NAEEM, M. Estimation of selected residual antibiotics in muscle, kidney, liver, and egg of layer chicken. *Institute of Chemistry, University of the Punjab, Lahore, Pakistan and Applied Chemistry Research Centre, PCSIR Labs Complex, Ferozepur Road, Lahore, Pakistan*. Received July 2005, accepted October 2005.

ALMEIDA, M. P., REZENDE, C. P., FERREIRA, F. D. SOUZA, L. F., ASSIS, D. C. S. FIGUEIREDO, T. C, LEITE. M. O, CANÇADO, S. V. Optimization and validation method to evaluate the residues of  $\beta$ -lactams and tetracyclines in kidney tissue by UPLC–MS/MS, PLoS ONE 11(11): e0166402. doi:10.1371/journal.pone.0166402, 2015.

ALMEIDA, M. P. *Otimização e validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório para determinação de multirresíduos de  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclina em rim por CLUE-EM/EM*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Chichester, 2003.

ASSIS, D.C.S., DA SILVA, G.R., LANZA, I.P., RIBEIRO, A.C.d.S.R., LANA, A.M.Q., LARA, L.J.C., et al. (2016) Evaluation of the Presence and Levels of Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Sulfaquinoxaline and Oxytetracycline in Broiler Chickens after Drug Administration. PLoS ONE 11(11): e0166402. doi:10.1371/journal.pone.0166402.

ASSIS, D. C. S. *Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento*. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.

BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.540, p.19-32, 2004.

BOGIALLI, S.; CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 395, p.947-966, 2009.

BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D.; HERRANZ, S.; RODRIGUEZ, E. An overview of sample preparation producers for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.395, p. 921-946, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa SDA nº 20, de 26 de julho de 2018*. Publica o subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC de 2018 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos, na forma do Anexo desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 julho 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 171, de 13 de dezembro de 2018*. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. Brasília. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dezembro 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 09, de 08 de março de 2017*. Plano de Amostragem e Limites de Referência Para O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC. 2017. Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-decontrole-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf>>. Acesso em: 26 dez.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011.

BRASIL. *Portaria nº 527 de 15 de agosto de 1995*. Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB, as incumbências que cita. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 16 agosto 1995, Seção 2, p.6048.

BRASIL. *Portaria nº 51 de 06 de maio de 1986*. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 07 fevereiro 1986, Seção 1, p.2228.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1991.

BOOTH, N.H; MCDONALD, L. E; *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 6ª edição, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1992.

CALDEIRA, L. G. M. *Pesquisa de Resíduos de Antimicrobianos em Ovos e Validação de Métodos Multirresíduos Qualitativo e Confirmatório por Cromatografia Líquida Aliada a Espectrometria de Massas Sequencial*. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégias e validação*. São Carlos: Ed. Edufscar, 2001. 77p.

CHIARADIA, M.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. *Química Nova*; Vol. 31, n. 3; páginas 623-636; 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). *Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods*: Updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission July 2012. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/?id=15197>. Acesso em: 11 fev. 2018.

COMPANYÓ, R.; GRANADOS, M.; GUÍTERAS, J.; Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods. *Analical Bioanalytical Chemistry*, v.1, n.395, p.877-891, 2009.

CONCERNING the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, p. 0008 – 0036, 2002 (Decision No 2002/657/EC of 12 August 2002).

CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEM, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTÍN, B. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* v. 34, p. 168–175, 2010.

CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A. V. C.; CORRÊA, A. B.; SALLES, A. S.; MATTOS, E. S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.55, n.4, Aug. 2003a.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21-25, 1998.

DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Wiley, NJ, 2006.

DOYLE, M. E. *Veterinary drug residues in processed meats – potential health risk*. FRI Briefings, 2006. Disponível em: <[www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief\\_VetDrgRes.pdf](http://www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf)> Acesso em Abril/10.

EC - Regulamento (CEE) nº 37/2010 – Regulamento (UE) Nº. 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*. 20.10.2010, L 15/1.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. *Mass spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications*. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, 2009, 388 p.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.*, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

ENGLERT, S. I. *Avicultura: tudo sobre raças, manejo e nutrição*. São Paulo: Agropecuária, 1998.

FDA, Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. *Enrofloxacin for Poultry: Notice of Hearing*, 2005. Disponível em <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2002-02-20/html/02-4082.htm>>. Acessado em: 10 de janeiro de 2019.

GARCÍA-OVANDO, H.; GORLA, N.; LUDERS, C.; POLONI, G.; ERRECALDE, C.; PRIETO, G.; PUELLES, I. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v.22, p. 209-12, 1999.

GOETTING, V.; LEE, K. A.; TELL, L. A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v. 34, n. 6, p. 521-556, 2011.

GÓRNIK, S. L. Sulfas, quinolonas e outros quimioterápicos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 409-441.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, v.1, n.83, p. 531–541, 1997.

GUERRERA, I., KLEINER, O. A. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci.Rep.*, v. 25, n.1/2, 2005.

GUIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGOTT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. *Teoria antimicrobiana em medicina veterinária*. São Paulo: Editora Roca, 2010. 683p.

HAMMEL Y, MOHAMED R, GREMAUD E, LEBRETON M, GUY PA. Multiscreening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A.* (2008); 1177(1), 58-76.

HOFF, R. *Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas*. 2008. 134p. Dissertação em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass spectrometry principles and applications*. 3 ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489p.

HUCK, C. W., BONN, G. K., Review Recent developments in polymer-based sorbents for solidphase extraction. *Journal of Chromatography A* 885 (2000) 51–72.

IAFIGLIOLA, M. C.; MENTEN, J. F. M.; ROCANICCI, A. M. C.; GAIOTTO, J. B. Cobre e Antibiótico como Promotores de Crescimento em Rações para Frangos de Corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v. 2, n. 3, 201-208p. Set. 2000.

ITO, N.M.K.; MYIYAJI, C.I.; LIMA, E.A. et al. Antimicrobianos: Usos preventivos e curativos em avicultura. In: Palermo-Neto, J., Spinosa, HS. & Górnaiak, SL.: *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. São Paulo: Editora Roca, p. 115-147, 2005.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. *Química Nova*, v. 32, p.996-1012, 2009.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*.v.1, n.1216, p.7977-8015, 2009.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v.1, p.35-61, 2009.

LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet J.*, v. 205, p. 21-7, 2015.

LANZA, I. P. *Utilização de antimicrobianos em galinhas de postura e avaliação do perfil de resistência de micro-organismos isolados da casca dos ovos*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2016.

LIMA, A. L. *Pesquisa de resíduos de anticoccidianos por LC-MS/MS em frangos de corte submetidos a tratamento farmacológico*. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER. *Jornal de microbiologia de brock*. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 10.ed. 608 p.

MILTENBURG G. Promotores e aditivos de crescimento em avicultura. In: *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas 2000*; Campinas, São Paulo. Brasil. p. 205-215.

NIESSEN, W. M. A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Third Edition (Chromatographic Science). Boca Raton: CRC Press, 2006.

PALERMO-NETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. *Farmacologia Aplicada à Avicultura*: Boas práticas no manejo de medicamentos. 1 São Paulo: Editora Roca, 2005. 366p.

PALERMO-NETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, (2008), 31:1190-1198.

PASTORE, V. A. A. *Desenvolvimento e validação de método de ensaio quantitativo e confirmatório por UPLC/MS-MS para determinação de monensina e fipronil em fígado bovino*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2018.

PATURKAR, A. M.; WASKAR, V. S.; MOKAL, K. V.; ZENDE, R. J. Antimicrobial drug residues in meat and their public health significance – a review. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 75, n. 9, p. 1103-1111, 2005.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Quim. Nova*, v. 31, p. 2190-2193, 2008.

POOLE, C. F., New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (2003) 362 – 373.

PORTO, H. S. M. *HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos*. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biotecnologia Farmacêutica, Universidade de Coimbra, Coimbra.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 2004.

ROCHA, D. G. *Desenvolvimento e Validação de Metodologia Multirresíduos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas para Análise de Fluorquinolonas em Músculo e Rim de Frangos*. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Faculdade de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

SILVEIRA, V. G. *Estudo de Depleção de Fluorquinolonas e Tetraciclinas em Frangos de Corte empregando LC-MS/MS*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. 2016.

SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I., SILVEIRA, P. R. S. Suinocultura Intensiva., *Embrapa – SPL*, Concórdia., p.67-71; 370-371, 1998

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd Ed., Wiley, 2009.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002 752p.

SPINOSA, H.S.; TÁRRAGA, K.M. Considerações Gerais sobre os Antimicrobianos. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 409-441.

SPISSO B. F. *Inocuidade de alimentos de origem animal: determinação de resíduos de ionóforos polióteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclina em leite por CLAE-EM/EM*. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS, Fiocruz, 2010.

STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *Journal of Chromatography A*. Amsterdam. v.1067, p. 15-53. 2005.

TOLEDO, G. S. P., COSTA, P. T. C., SILVA, L. P. et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. *Cienc. Rural*, v.37, n.6, p.1760-1764, nov./dec. 2007.

TYLOVA, T.; OLSOVSKA, J.; NOVAK, P.; FLIEGER, M.; High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere*. v.78, p.353– 359. 2010.

UNGEMACH, FR.; MULLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. V.296, p33-38, 2006.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr A*. v.921 p.227-236, 2001.

YANG, C., WANG, J., LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. *Analytica Chimica Acta*. 799 (2013) 8– 22.