

Arina Lopes de Lima

PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTICOCCIDIANOS POR LC-MS/MS EM
FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

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

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2016

Lima, Arina Lopes de, 1980-
L732p Pesquisa de resíduos de anticoccidianos por LC-MS/MS em frangos de corte submetidos

a tratamento farmacológico / Arina Lopes de Lima. - 2016.

73 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Carne de frango - Análise - Teses. 2. Resíduos de drogas em veterinária - Teses.
3. Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. 4. Espectrometria de massa - Teses.
I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

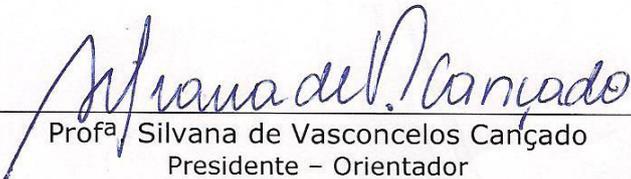
CDD - 664.939

FOLHA DE APROVAÇÃO

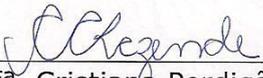
ARINA LOPES DE LIMA

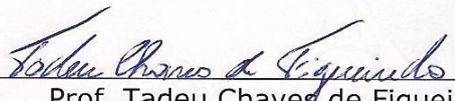
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

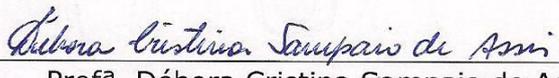
Aprovada em 29 de Fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Profª Silvana de Vasconcelos Caçado
Presidente - Orientador


Profª Andréa Melo Garcia de Oliveira
Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MAPA


Profª Cristiana Perdigão Rezende
Laboratório Aquacen - UFMG


Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo
Escola de Veterinária - UFMG


Profª Débora Cristina Sampaio de Assis
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir conquistar tantas coisas maravilhosas, principalmente cercada de pessoas especiais.

Ao meu marido, Leonardo, pelo companheirismo e incentivo. Aos meus filhos, Vitor e Lucas, por compreenderem a minha falta de tempo e correria.

Aos meus pais, Lauro e Conceição, pelo amor e apoio incondicional e a minha irmã, Ariane, pelas palavras de força nos momentos mais difíceis.

À profa Silvana de Vasconcelos Cançado, pela oportunidade, disponibilidade e ensinamentos.

Aos meus co-orientadores, Profa. Lilian Viana Teixeira e Prof. Leonardo José Camargos Lara, pela disponibilidade e contribuição nesse trabalho.

Aos professores e funcionários do DTIPOA, especialmente Prof. Marcelo Resende de Souza, Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo e Miltinho, especialmente à professora Débora pela disponibilidade e ajuda constante.

À Profa. Ângela Maria Quintão Lana, pela enorme ajuda no delineamento experimental e análises estatísticas.

À banca examinadora, Profa. Débora Cristina Sampaio de Assis, Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo, Dra. Andrea Melo Garcia de Oliveira, Dra. Cristiana Perdigão pela disponibilidade e sugestões.

À toda equipe do Laboratório de Resíduos de Medicamentos (LRM) do LANAGRO/MG do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), especialmente à Dra. Andrea Melo Garcia de Oliveira, pela parceria.

À toda equipe do Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do LANAGRO/RS do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), especialmente o Dr. Fabiano Barreto, Dra. Renata Batista Rau e Dra. Diana Alves de Sousa pela enorme ajuda e disponibilidade.

A todos os funcionários da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, pelo apoio durante a criação das aves. A toda equipe da empresa PHIBRO Saúde Animal, especialmente ao Bruno Honda e ao João Felipe.

Aos colegas de trabalho, Fátima, Larissa, Sérgio, Suzana e Valéria por compreenderem minhas ausências e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fornecimento de fundos para realização da pesquisa.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 13 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 3.1 | Coccidiose..... | 13 |
| 3.2 | Controle de Coccidiose | 15 |
| 3.3 | Agentes anticoccidianos:..... | 16 |
| 3.3.1 | Mecanismos de ação dos anticoccidianos: | 18 |
| 3.3.2 | Metabolização e estudos de depleção dos anticoccidianos..... | 19 |
| 3.4 | Contaminação de ração com anticoccidianos..... | 24 |
| 3.5 | Legislação | 25 |
| 3.6 | Programas de monitoramento de resíduos em produtos de origem animal..... | 27 |
| 3.7 | Métodos de detecção de resíduos em produtos de origem animal | 29 |
| 3.7.1 | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas .. | 29 |
| 3.8 | Presença de resíduos de anticoccidianos em produtos de origem animal | 34 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1 | Tratamentos..... | 36 |
| 4.2 | Análises de resíduos de anticoccidianos | 39 |
| 4.2.1 | Padrões, soluções e reagentes | 39 |
| 4.2.2 | Extração das amostras | 40 |
| 4.3 | Delineamento Experimental | 41 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 5.1 | Concentração de anticoccidianos nas rações..... | 41 |
| 5.2 | Pesquisa de resíduos de anticoccidianos em músculo de frangos de corte | 42 |
| 5.2.1 | Grupo controle..... | 42 |
| 5.2.2 | Nicarbazina..... | 47 |
| 5.2.3 | Narasina + Nicarbazina | 50 |
| 5.2.4 | Salinomicina | 55 |
| 5.2.5 | Monensina | 58 |
| 5.2.6 | Semduramicina..... | 61 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 65 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 Limites máximos de 1% e 3% de contaminação cruzada de ração, para todos os Anticoccidianos permitidos na Comunidade Europeia | 24 |
| Tabela 2 anticoccidianos autorizados no brasil e seus respectivos teores permitidos na Ração e o período de retirada | 26 |
| Tabela 3. Composição das rações fornecidas aos frangos de corte para os tratamentos A(Control), B(nicarbazina), C (nicarbazina + narasina), D (salinomicina), E (semduramicina) e F (monensina)..... | 37 |
| Tabela 4. Resultados das concentrações médias de resíduos de nicarbazina analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento com nicarbazina e de avaliação residual..... | 47 |
| Tabela 5 Resultados das concentrações médias de resíduos de DNC analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, durante o período de tratamento com nicarbazina + narasina e durante a avaliação residual..... | 51 |
| Tabela 6 Resultados quantificáveis de resíduos de narasina analisados pelo método HPLC MS/MS na matriz músculo de frango de corte, durante o período de tratamento com nicarbazina + narasina e durante a avaliação residual..... | 51 |
| Tabela 7 Resultados das concentrações médias de resíduos de monensina analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, durante os períodos de tratamento com monensina e durante a avaliação residual | 58 |
| Tabela 8. Resultados das concentrações médias de resíduos de semduramicina analisadas pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, tratados com semduramicina, durante o período de tratamento e de avaliação residual | 62 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 LMR ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) para anticoccidianos definidos pelo <i>Codex</i> , referenciados pelas legislações do Brasil, dos EUA, da União Europeia e do Canadá | 27 |
| Quadro 2 Resultados das análises fiscais de anticoccidianos realizadas pelo MAPA em músculo de frangos de corte no período de 2008 a 2014 | 29 |
| Quadro 3 Tratamentos, rações fornecidas, número de animais eutanasiados, idade das aves no momento da eutanásia por tratamento..... | 38 |
| Quadro 4 Transições MRM e as condições espectrométricas utilizadas para cada anticoccidiano pesquisado..... | 41 |
| Quadro 5 Quantidade em ppm de anticoccidianos utilizadas na produção de cada ração e a quantidade real fornecida após análise das rações por cromatografia..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> spp. | 15 |
| Figura 2 Estrutura química da nicarbazina | 17 |
| Figura 3 Estrutura química dos ionóforos | 18 |
| Figura 4 Atuação de diferentes anticoccidianos durante o ciclo de vida da <i>Eimeria</i> | 19 |
| Figura 5 Componentes de um espectrômetro de massas: fonte de ionização, analisador de massas, detector de íons. | 30 |
| Figura 6 Cromatogramas dos padrões internos no modo positivo (Decq-d5) e negativo (DNC-d8), e dos analitos pesquisados, referentes as amostras de músculo de frangos de corte, pertencente ao grupo controle, coletadas nos dias 14, 21, 28 e 35 | 43 |
| Figura 7 Concentrações médias de DNC x LMR, analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante o período de tratamento com nicarbazina e durante a avaliação residual. | 48 |
| Figura 8 Cromatogramas referentes as amostras de músculo de frangos de corte, coletadas nos dias 14, 21, 22, 23, 25 e 27 dos animais tratados com nicarbazina..... | 48 |
| Figura 9 Cromatogramas referentes as amostras de músculo de frangos de corte, coletadas nos dias 14, 21, 28, 29, 30, 32 e 34 dos animais tratados com nicarbazina + narasina na ração | 51 |
| Figura 10 Concentrações médias de resíduos de DNC x LMR analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, dos animais tratados com nicarbazina + narasina, durante o período de tratamento e de avaliação residual..... | 55 |
| Figura 11 Cromatogramas referentes as amostras de músculo da coxa e do peito coletadas nos dias 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 e 41 dos frangos de corte tratados com salinomicina na ração | 56 |
| Figura 12 Concentrações médias de resíduos de monensina x LMR analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, dos animais tratados com monensina, durante o período de tratamento e de avaliação residual | 59 |
| Figura 13 Cromatogramas referentes as amostras coletadas nos dias 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 e 41 dos animais tratados com monensina na ração | 59 |
| Figura 14 Concentrações médias de resíduos de semduramicina x LMR analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, dos animais tratados com semduramicina, durante o período de tratamento e de avaliação residual | 62 |
| Figura 15 Cromatogramas referentes as amostras de músculo de coxa e de peito coletadas nos dias 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 e 41 dos animais tratados com semduramicina na ração | 63 |

RESUMO

Com objetivo de avaliar a presença e os níveis de resíduos de anticoccidianos em amostras de músculo de frangos de corte, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS), foram utilizados 720 frangos de corte da linhagem Cobb criados por 41 dias. Os tratamentos, definidos de acordo com o medicamento fornecido às aves via ração, foram os seguintes: A- controle (sem anticoccidiano durante todo o período de criação); B- nicarbazina (ração contendo nicarbazina do primeiro até o 21º dia de criação); C- nicarbazina + narasina (nicarbazina + narasina na ração do primeiro até o 28º dia de criação); D- salinomicina (com o anticoccidiano do primeiro até o 34º dia de criação); E- semduramicina (com o anticoccidiano do primeiro até o 34º dia de criação) e; F- monensina (com o anticoccidiano do primeiro até o 34º dia de criação). Para coleta de amostras do músculo do peito e da coxa e avaliação de resíduos das drogas utilizadas foram abatidas seis aves por tratamento semanalmente durante o período de fornecimento da ração com medicamento e por mais seis dias após a retirada do anticoccidiano. Resíduos de dinitrocarbalinida (DNC), metabólito da Nicarbazina, acima do limite máximo de resíduos (LMR) aceitável ($200 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) foram observados nos dois tratamentos em que ela foi utilizada, no tratamento B até o sexto dia após a retirada da ração contendo o medicamento e, no tratamento C até o quarto dia após a retirada dos medicamentos da ração. Resíduos de semduramicina, acima do LMR ($50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) foram observados apenas durante seu fornecimento via ração e, resíduos de narasina e monesina não ultrapassaram os valores de LMR ($15 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ respectivamente) nem durante o fornecimento da ração com o medicamento. A salinomicina não apresentou resíduos possíveis de serem detectados pelo método utilizado durante todo o período do tratamento.

Palavras chave: carne de frango, resíduos, anticoccidianos, HPLC/MS-MS

ABSTRACT

In order to evaluate the presence and levels of anticoccidial residue in broiler chickens muscle, by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC / MS-MS) were used 720 broiler chickens from Cobb line, reared by 41 days. The treatments, defined according to the anticoccidial provided by ration to poultry, were as follows: A- control (no anticoccidial throughout the breeding period); B- nicarbazin (with anticoccidial from the first to the 21th day of rearing); C- nicarbazin + narasin (with anticoccidial from the first to the 28th day of rearing); D salinomycin (with anticoccidial from the first to the 34th day of rearing); E semduramicin (with anticoccidial from the first to the 34th day of rearing) and; F- monensin (with anticoccidial from the first to the 34th day of rearing). To collect thigh and breast muscle samples and evaluation of drug residues used were slaughtered six birds per treatment weekly during the feeding period with anticoccidial and for six days after the discontinuation of the drug. Nicarbazin residues (dinitrocarbalinida - DNC) were observed in both treatment where it was used until the sixth day of the withdrawal period and until the fourth day of withdrawal period, the DNC values were above the maximum residue limit (MRL) acceptable by global regulatory agencies ($200 \mu\text{g.Kg}^{-1}$). Semduramicin residues above the MRL ($50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) were only observed during feeding period with the drug and narasin and monesin residues did not exceed the MRL values ($15 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectively) neither the feeding period with the drugs. The salinomycin showed no possible residues to be detected by the method used throughout the treatment period.

Keywords: broiler chicken meat; residues; anticoccidial; HPLC/MS-MS

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de carne de frango em 2015 foi de 13,14 milhões de toneladas, mantendo o país na posição de segundo maior produtor ficando atrás somente dos Estados Unidos (17,25 milhões de toneladas). Do volume total de frangos produzido, 67,3% foram destinados ao consumo interno e 32,7% para exportações, sendo que esse volume exportado colocou o país na posição de maior exportador mundial de carne de aves (ABPA, 2016). O sucesso da avicultura nacional é decorrência direta dos avanços tecnológicos ligados à seleção genética e ao manejo das aves, e essa característica tem feito com que a avicultura possua os mais destacados índices de produtividade entre os diversos segmentos da pecuária, pois a indústria avícola se caracteriza pela contínua agregação de novas tecnologias.

A presença de doenças infecciosas nas granjas, entre elas a coccidiose, causa sérios prejuízos econômicos à avicultura, sendo importante que os técnicos e produtores estejam atentos aos agentes infecciosos, à epidemiologia e às medidas profiláticas a serem adotadas. É essencial manter estritas medidas de higiene e de biossegurança na granja para manter a concentração de oocistos a mais baixa possível. O conceito de integridade intestinal com a proliferação de uma microbiota eutrófica, tem uma relação direta com o uso dos agentes anticoccidianos, que atuam como coadjuvantes a outros agentes manipuladores do parasita no intestino das aves, e dessa forma, são considerados como fatores fundamentais na manutenção do equilíbrio intestinal (Dutra, 2002).

Por serem utilizados por longos períodos durante a criação, resíduos de anticoccidianos podem estar presentes nos produtos de origem animal, podendo ser um fator de risco para a saúde humana. Dessa maneira, para garantir a segurança no consumo de carne de frango é preciso respeitar o período de retirada determinado para cada medicamento. Esse período é o tempo necessário para que a concentração de resíduos de uma determinada droga, ou seus metabólitos, reduza a níveis iguais ou inferiores ao nível de tolerância nos tecidos de 99% dos animais do lote.

O cálculo do período de carência de um medicamento é feito por um método estatístico que foi proposto pelo Comitê de Medicamentos para uso Veterinário (*Committee for Veterinary Medicinal Products - CVMP*) da Agência Europeia de Medicina (EMA) em 1995. O CVMP é responsável pela elaboração de pareceres sobre questões relativas às drogas veterinárias e regulamenta esses assuntos (Myllyniemi, 2004; Doyle, 2006).

O nível de tolerância de uma droga é compreendido como Limite Máximo de Resíduos (LMR). Os valores de LMR são determinados por diversos órgãos regulatórios mundiais, como o *Codex Alimentarius* e o Comitê de Produtos Alimentares da Agência Europeia de Medicina (EMA). A competência de estabelecer o LMR no Brasil é do Ministério da Saúde e quando não há valores nacionais estabelecidos, são utilizados os valores de LMR harmonizados e internalizados no âmbito do MERCOSUL, do *Codex Alimentarius*, das Diretivas da União Europeia ou da Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration, FDA*) (Brasil, 1999).

A concentração máxima aceitável e legalmente permitida de resíduos de medicamentos veterinário em produtos de origem animal é expressa em microgramas por quilograma ou por litro ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g.L}^{-1}$) de alimento e é calculada com base na Ingestão Diária Aceitável (IDA), que, por sua vez, é a quantidade expressa em miligramas por quilograma (mg.Kg^{-1}) ou $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de peso

corporal, que pode ser ingerida diariamente por um ser humano durante toda a sua vida, sem riscos apreciáveis à sua saúde. A IDA é determinada com base nos níveis máximos de ingestão de cada droga em que não se observam efeitos deletérios por meio de testes toxicológicos (teratogenicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e efeitos imunopatológicos) executados em animais (EEC, 1990; Mitchel et al., 1998).

Para atender às exigências do mercado internacional, foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 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 n° 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial n° 527, de 15 de agosto de 1995, e contém tabelas que regulamentam o controle de anticoccidianos, entre outros, em carnes, leite, mel, ovos, pescados e seus derivados (Brasil, 1986; Brasil, 1995).

A presença de resíduos de anticoccidianos em produtos de origem animal pode ser detectada por diversos métodos analíticos, dos quais se destacam os métodos microbiológicos, de ensaio por inibição enzimática e imunoensaios. Existem também métodos de análise por ensaios físico-químicos que utilizam, principalmente, técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas que podem confirmar e quantificar a presença de resíduos das drogas nos alimentos (Becker et al., 2004). Os laboratórios que realizam análises de resíduos de anticoccidianos principalmente em alimentos necessitam ter alta capacidade técnica. Todos os métodos analíticos utilizados precisam ser de alta confiabilidade, que é garantida com o emprego de procedimentos de validação bem elaborados visando produzir alimentos mais seguros para o consumidor (Paschoal et al., 2008).

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a presença e os níveis de resíduos de anticoccidianos em amostras de músculo de frangos de corte, que foram tratados com nicarbazina, nicarbazina + narasina, salinomocina, monensina e semduramicina na ração e avaliar o período residual após a interrupção do fornecimento desses medicamentos utilizando metodologia validada de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Coccidiose

A coccidiose é uma doença parasitária causada por protozoários intracelulares dos gêneros *Eimeria* spp., *Isospora* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma* spp. e *Cryptosporidium* spp. que podem acometer o trato gastrointestinal dos animais. Protozoários da classe *Coccidia* são hospedeiro-específicos, ou seja, cada espécie de protozoário ataca uma espécie de animal. As espécies importantes para as aves são *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* e *E. acervulina*. Normalmente, essa doença se manifesta na forma subclínica e resulta em retardo do crescimento, diminuição do ganho de peso e piora na conversão alimentar sem causar mortalidade. Em casos específicos, se manifesta na forma clínica causando enterite e diarreia, com conseqüente diminuição na absorção intestinal de nutrientes. Também pode ocorrer

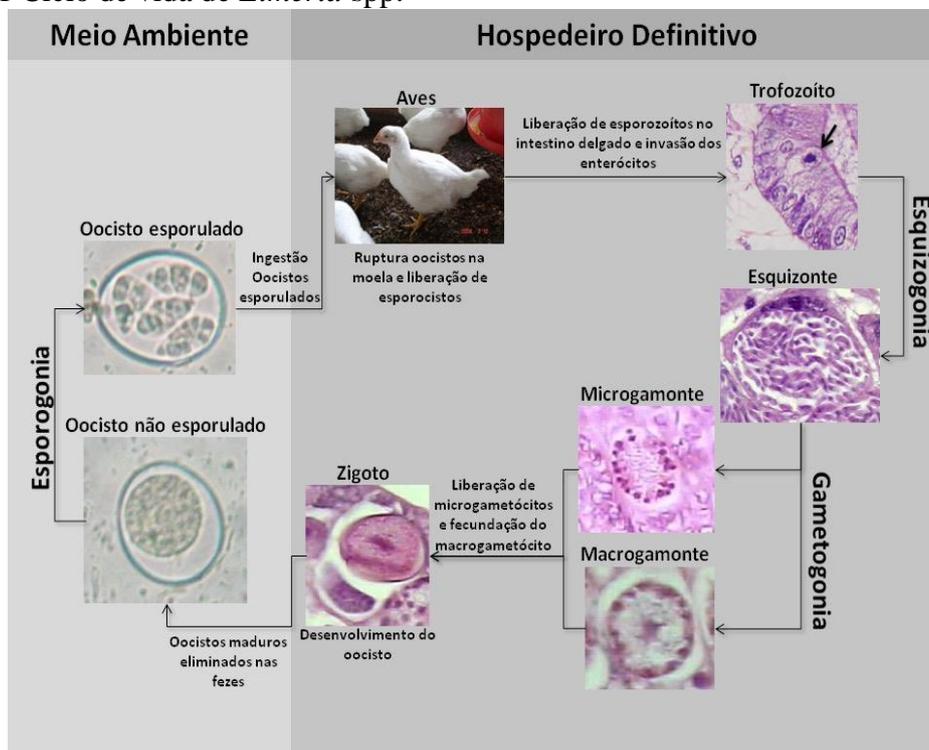
um efeito sinérgico da coccidiose com outros agentes patogênicos como, por exemplo, *Clostridium* spp., *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Gonzales, 2001; Piráquine, 2010).

Segundo Costa (2001), *E. acervulina*, *E. máxima* e *E. tenella* são os protozoários mais comuns em frango de corte e têm a sua ocorrência monitorada nessas criações por meio das lesões macroscópicas observadas no intestino das aves. *E. mitis* e *E. praecox* também são comuns em frango de corte, mas não são monitoradas, em parte por não produzirem lesões macroscópicas que facilitem esse monitoramento e também por não serem consideradas importantes na cadeia produtiva. *E. brunetti* possivelmente não ocorre no Brasil e *E. necatrix* é o agente comum de coccidiose em matrizes.

O ciclo de vida de *Eimeria* spp. é dividido em três etapas: merogonia ou esquizogonia (fase assexuada- endógena), gametogonia (fase sexuada- endógena) e esporogonia (esporulação- exógena) (Fig.1). Todo ciclo é desenvolvido em um único hospedeiro (monoxeno). As aves se infectam ao ingerirem oocistos esporulados presentes na cama, na água, no alimento ou no solo. Os oocistos rompem-se sob ação mecânica da moela e ação enzimática da quimiotripsina e sais biliares, liberando os esporozoítos. Esses infectam as células da mucosa intestinal. Dentro da célula intestinal os esporozoítos se transformam em trofozoíto. O trofozoíto sofre diversas divisões mitóticas, processo chamado de esquizogonia ou merogonia, formando os merozoítos. O conjunto de merozoítos é chamado de esquizonte. Os merozoítos da geração final de esquizogonia penetram em novas células intestinais e iniciam a fase sexuada do ciclo endógeno. Nessa fase os merozoítos se diferenciam em microgamontes (masculino) e macrogamontes (feminino). Os microgametas fecundam os macrogametas formando o zigoto e posteriormente os oocistos não esporulados. Os oocistos não esporulados são eliminados juntamente com as fezes e no meio ambiente dependendo das condições de temperatura, umidade e presença de oxigênio, sofrem o processo de esporogonia, tornando-se esporulado e infectante (Levine, 1988; Kawazoe, 2000; Fortes, 2004).

Para sobreviver, em nível celular, as coccídeas dependem de dois ciclos para obtenção de energia, conhecidos como glicólise e sistema de transporte de elétrons (ETS). A glicólise ocorre predominantemente nos estágios extracelulares do ciclo vital dos parasitas, enquanto as coccídeas ainda estão na luz do trato intestinal da ave. Após a invasão das células da parede intestinal, há predominância dos ETS. A glicólise, atuando na ausência de oxigênio, gera duas unidades de energia a partir de cada molécula de glicose, assegurando a energia para a manutenção do parasita. O ETS, que necessita da presença de oxigênio molecular, fornece 15 vezes mais unidades de energia por molécula de glicose (Evans, 2010).

Figura 1 Ciclo de vida de *Eimeria* spp.



Fonte: Martins et al., 2012.

As perdas na avicultura de corte associadas à coccidiose são acentuadas devido ao ciclo produtivo curto e a alta densidade de criação, que promove reinfecção das aves e dificulta um programa de controle efetivo (Zhao et al., 2001). Um animal com coccidiose elimina uma grande quantidade de oocistos nas excretas, os quais podem permanecer viáveis por muitos anos, além de poderem ser transportados para outras áreas de diversas maneiras (animais, homem, equipamentos) expandindo ainda mais a contaminação (Gonzales, 2001).

A reinfecção dos frangos com oocistos é potencializada pela existência de material de cama de frango sobre os pisos dos aviários comerciais. Em criações intensivas, a utilização da cama do aviário visa evitar o contato direto da ave com o piso, servir de substrato para absorção da água, incorporação de fezes e contribuir para a redução das oscilações de temperatura no aviário. A utilização de cama nova a cada lote seria o ideal do ponto de vista da saúde animal. Porém, devido à escassez de matéria-prima, aumento de custos e impacto ambiental da disposição desses resíduos, o reaproveitamento da cama nos aviários tornou-se uma prática comum, que pode favorecer a permanência desses agentes no ambiente (Fiorentin, 2005).

3.2 Controle de Coccidiose

Segundo Gonzales (2001), existem três métodos de controlar a coccidiose, que são os sanitários (desinfecção), os medicamentosos (preventiva e curativa) e os imunológicos (vacina). A

utilização de métodos sanitários de controle, como prática isolada, dificilmente resulta no controle da doença. Desse modo, para um controle efetivo é necessária a associação entre os três métodos.

O correto manejo da cama e do ambiente é de extrema importância no combate a coccidiose. A cama é um dos locais onde ocorre parte do ciclo do protozoário, e o tratamento correto para a reutilização contribuirá para a menor sobrevivência de oocistos que poderão contaminar lotes futuros (Nery, 2009).

A utilização de vacinas é uma alternativa que vem ganhando destaque em plantéis de reprodução. As vacinas de oocistos vivos podem ser administradas de várias maneiras. Tradicionalmente, têm sido administradas na ração ou na água, normalmente durante os primeiros quatro dias de vida da ave. A exposição aos oocistos provoca proteção necessária para manter o peso e a uniformidade das aves durante a fase de crescimento. A imunidade conferida pela vacina viva de baixa dose e atenuada é protetora, pois permite o desenvolvimento completo do ciclo do parasita, estimulando todas as vias de resposta imune (Lillehoj et al., 2000; Nery, 2009).

Quando as manifestações clínicas são acentuadas, o tratamento do animal doente é de valor relativo porque já houve destruição de tecidos do hospedeiro e nenhuma droga é capaz de regenerá-los. O tratamento iniciado logo após o aparecimento dos primeiros sintomas é capaz de controlar a doença antes que atinja todo o lote susceptível. Em lotes de animais confinados, o uso de drogas específicas deve ser recomendado para todos os animais susceptíveis e mantidos no ambiente contaminado. Os lotes de frangos doentes devem receber tratamento sintomático para controlar a diarreia, a desidratação e as frequentes infecções secundárias (Lima, 2004).

Existem diversos programas de controle de coccidiose aviária baseados na adição de medicamentos na ração das aves já no primeiro dia de vida das aves até o 37º ou 38º dia de idade dos frangos. Esses programas visam prevenir a coccidiose e minimizar os prejuízos decorrentes dos surtos da doença nos plantéis avícolas. Os programas mais utilizados atualmente são: o cheio (ou contínuo) e o dual (ou duplo) (Kawazoe, 2000; Ferreira, 2011).

No programa cheio, utiliza-se um determinado medicamento continuamente na ração, respeitando-se os períodos de retirada, que podem variar de 3 a 10 dias, ou mesmo sem o uso de períodos de retirada do medicamento no final do ciclo de produção. Nesse caso é importante salientar que determinados medicamentos deixam resíduos na carcaça podendo ser um risco potencial e indesejável para saúde pública (Ferreira, 2011).

No programa dual, utiliza-se um determinado medicamento na primeira fase de produção (1º ao 21º dia de idade) e outro na segunda fase (22º ao 38º dia de idade). Na primeira fase normalmente é fornecido um anticoccidiano sintético, como a nicarbazina, que elimina uma grande parte das eimerias em uma idade em que se nota aumento do desafio. Na segunda fase é utilizado um ionóforo que permite o escape de alguns coccídeos que completarão o ciclo, proporcionando o aparecimento de lesões na mucosa intestinal, mas com vantagem de beneficiar enormemente o desenvolvimento de imunidade celular. O uso de medicamentos combinados é desejável e eficaz, pois ocorre diminuição das concentrações medicamentosas em relação ao uso dos mesmos medicamentos em dose única (Ferreira, 2011).

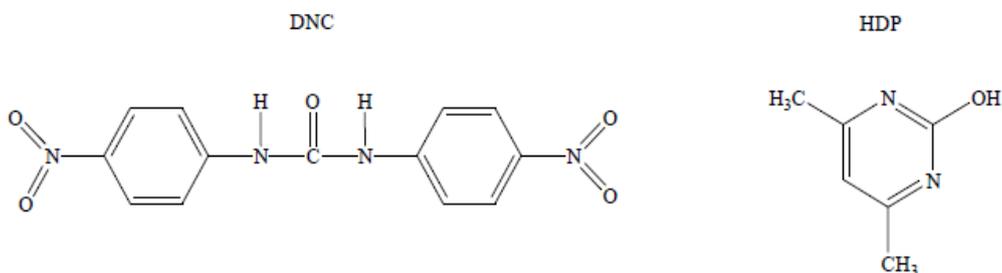
3.3 Agentes anticoccidianos:

O uso de agentes anticoccidianos no controle da coccidiose em frangos de corte é uma medida preventiva muito utilizada na produção. Porém, o êxito do produto dependerá do período de utilização da droga, das recomendações de uso, bem como qual a dosagem e em que época do ano utilizar, da interação sinérgica ou antagônica com outros medicamentos, do desafio existente na granja e da resistência dos parasitas ao princípio ativo (Andrade, 2004).

Existem dois grupos de anticoccidianos, os sintetizados quimicamente, tais como sulfaquinoxalina, robenidine, diclazuril, toltrazuril, amprólio e nicarbazina e os ionóforos, naturalmente produzidos por fermentação, como a monensina, lasalocida, salinomocina, maduramicina, narasina e semduramicina.

Nicarbazina é o nome genérico de um complexo equimolar de 4,4- dinitrocarbalinida (DNC) e 2 hidroxi, 4,6 dimetilpirimidina (HDP), usado como aditivo alimentar na concentração máxima de 125mg/kg de peso vivo, para prevenção de coccidiose em frangos de corte (Fig. 2) (EFSA, 2008b). A utilização desse anticoccidiano leva ao aumento do débito cardíaco e queda na taxa respiratória, podendo causar morte por estresse calórico, quando os animais são mantidos em temperaturas elevadas. Devido ao aumento do metabolismo causado pela nicarbazina, seu uso não é recomendado para frangos de corte em fase de crescimento (Beers et al., 1989; Wiernusz e Teeter, 1995). Também não deve ser ministrado a poedeiras e reprodutoras nas fases de postura, pois os resíduos podem comprometer a qualidade, a pigmentação e o tamanho do ovo destinado ao consumo. A qualidade dos ovos férteis também é seriamente comprometida pela nicarbazina, observando-se a diminuição na eclodibilidade (Ferreira, 2011).

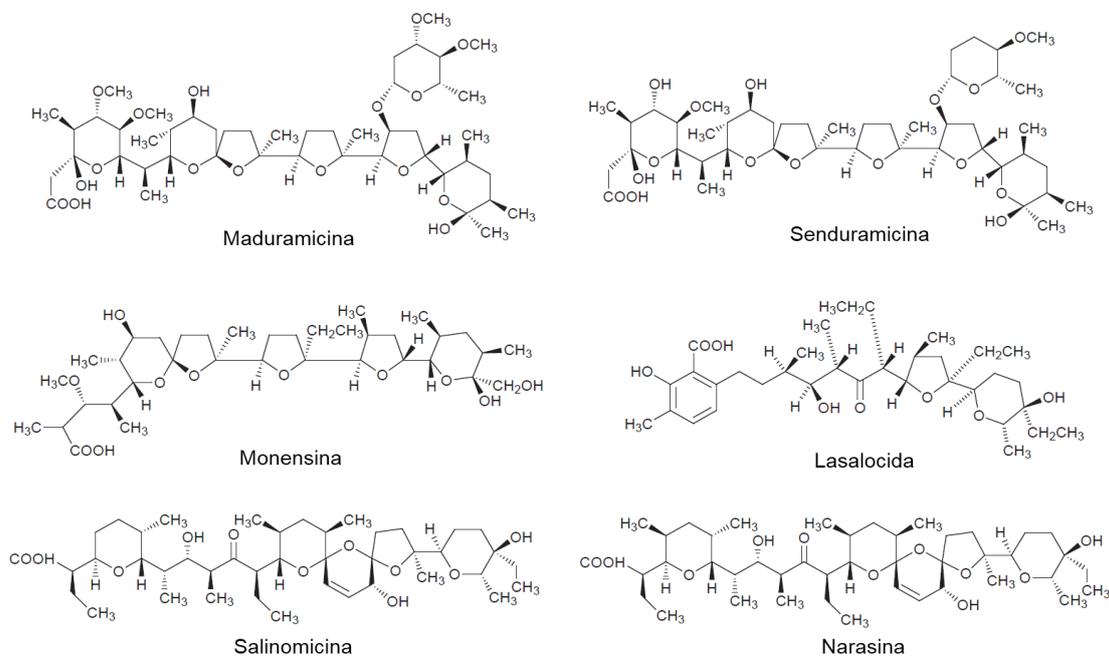
Figura 2 Estrutura química da nicarbazina



Fonte: EFSA, 2008b

Os ionóforos são compostos de poliéteres do ácido carboxílico, produzidos por fermentação (Fig. 3). A lasalocida, a monensina, a narasina, a salinomocina e a semduramicina são produzidas pelos micro-organismos *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces albus*, e *Actinomadura roseorufa*, respectivamente (Dutra, 2002).

Figura 3 Estrutura química dos ionóforos



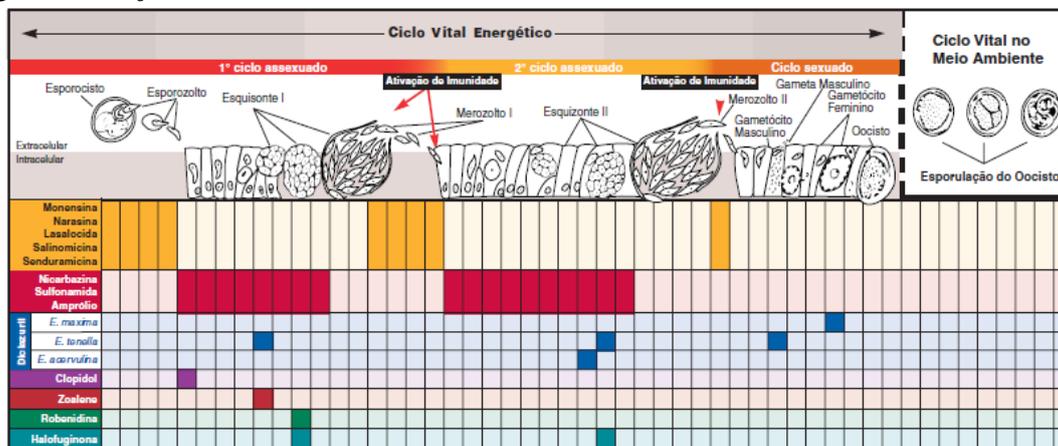
Fonte: Dubois, 2004

3.3.1 Mecanismos de ação dos anticoccidianos:

Os diversos compostos químicos possuem mecanismos de ação bastante específicos direcionados para o metabolismo dos parasitas (Fig. 4). Essas drogas podem ser coccidiostáticas e/ou coccidicidas e o efeito sobre o parasita vai desde a interferência com o metabolismo mitocondrial (clopidol, decoquinato, nicarbazina, robenidina) até o antagonismo com vitaminas (amprólio) (Dutra, 2002).

A nicarbazina atua na fase de esquizonte de 2ª geração e em menor grau na fase de esquizonte de 1ª geração, interferindo no metabolismo mitocondrial, interrompendo o ciclo de formação e desenvolvimento dos merozoítos. A molécula de nicarbazina pode penetrar na célula coccidiana e paralisar o suprimento de energia intracelular (ATP) cessando dessa forma o funcionamento da bomba de sódio e potássio. Com isso ocorre um influxo abundante de sódio e consequentemente de água levando a morte celular (EFSA, 2003; Kant et al., 2013).

Figura 4 Atuação de diferentes anticoccidianos durante o ciclo de vida da *Eimeria*



Fonte: Evans, 2010.

Os ionóforos atuam como carreadores de íons que formam complexos lipídicos solúveis com cátions, preferencialmente com potássio (K^+), sódio (Na^+), cálcio (Ca^{++}), magnésio (Mg^{++}), permitindo que esses íons atravessassem a membrana celular do parasita, promovendo desbalanço no transporte iônico normal na membrana celular e levando à morte do protozoário (EFSA, 2004; Bellaver, 2005).

O uso concomitante de narasina e nicarbazina afeta o sistema de produção de energia das células coccidianas através de diferentes vias. O controle e a morte do parasita são resultantes da alteração e da interrupção dos mecanismos de fornecimento de energia à célula. À medida que as coccídeas invadem o trato digestivo da ave, a narasina atua sobre as membranas da célula coccidiana, promovendo a entrada de sódio. Ocorre uma depleção das reservas de energia de manutenção do organismo pela ativação do mecanismo da bomba de sódio-potássio para remover o excesso de sódio do interior das células. Quando ocorre a depleção da energia, cessa o funcionamento do mecanismo das bombas. A lise das células coccidianas ocorre quando a pressão osmótica no interior do parasita passa a ser excessiva e as membranas celulares não mais a suportam. Os organismos sobreviventes à ação da narasina penetram nas células do epitélio intestinal da ave, mas já estão enfraquecidos e se reproduzem com menor eficiência. Quando o esporozoíto coccidiano penetra o enterócito do hospedeiro, tem imediato acesso ao oxigênio molecular e o ETS, localizado na mitocôndria do parasito, é ativado. A nicarbazina interfere no processo de fosforilação oxidativa fundamental para as vias ETS do parasita e a coccídea invasora é privada da fonte de obtenção de energia necessária para manter um ambiente estável, o que leva à morte do parasita (Evans, 2010).

3.3.2 Metabolização e estudos de depleção dos anticoccidianos

3.3.2.1 Nicarbazina

Quando a nicarbazina é fornecida na ração de frangos de corte, a fração HDP atua aumentando a absorção intestinal enquanto que o DNC atua como coccidiostático (Cuckler et al., 1955; Rogers et al., 1983). Estudos de metabolização mostram que parte do fármaco não é absorvido, sendo

eliminado pelas fezes. Na parte absorvida, o HDP é eliminado dentro de 24 horas e o DNC permanece no sangue por aproximadamente quatro dias antes de ser eliminado (Yoder, 2005). Dessa forma, a análise de resíduos de nicarbazina é baseada na molécula de DNC (Clarke, et al., 2014).

Cannavan e Kennedy (2000) realizaram dois experimentos para avaliar os níveis de resíduos de nicarbazina em tecidos de frangos de corte. O primeiro experimento foi realizado com o objetivo de determinar se o fornecimento de nicarbazina até o 28º dia com nove dias de período de retirada resultaria em resíduos de DNC, no fígado e no músculo das aves alojadas em cama ou em gaiola, acima do LMR (200 µg.Kg⁻¹). Foram alojados 10 frangos de corte, divididos em dois grupos. Um grupo alojado em cama e outro em gaiola. Os dois grupos receberam ração contendo 100 ppm de nicarbazina até o 28º dia e após esse período até o 37º dia, as aves receberam ração sem anticoccidiano. Os animais foram abatidos após os nove dias do período de retirada e amostras de fígado e músculo foram coletadas para pesquisa de DNC por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). Maiores concentrações de DNC foram encontradas nas aves alojadas em cama sobrepostas. No fígado os níveis encontrados (223,8 ± 74,2 µg.Kg⁻¹) após nove dias do período de retirada ultrapassaram o LMR, não sendo observado o mesmo no músculo (14,0 ± 8,4 µg.Kg⁻¹). Nas aves alojadas em gaiola, as médias das concentrações de DNC foram abaixo do LMR tanto no músculo (2,4 ± 0,3 µg.Kg⁻¹) quanto no fígado (23,7 ± 3,9 µg.Kg⁻¹). De acordo com os autores a cama foi a principal fonte de contaminação por nicarbazina, e devido ao processo de reciclagem fecal, maiores níveis de DNC foram encontrados nas aves alojadas em cama.

O segundo experimento realizado por Cannavan e Kennedy (2000) objetivou estabelecer uma relação entre o fornecimento de ração fortificadas com nicarbazina durante o período de retirada e a presença de resíduos de DNC nos tecidos. Foram utilizadas cinco dietas com diferentes concentrações de nicarbazina (0,2; 0,4; 1,6; 4,2 e 13,5ppm) e cinquenta frangos de corte divididos em cinco grupos com 10 animais cada. Para cada grupo de 10 animais, cinco foram criados em gaiola e cinco em cama sobreposta. Os animais receberam ração contendo lasalocida até o 32º dia, e após esse período cada grupo recebeu ração fortificada com nicarbazina até o 37º dia (equivalente a cinco dias de período de retirada). Após esse período as aves foram abatidas e amostras de fígado e músculo foram coletadas para a pesquisa de resíduos de DNC por LC-MS. Foi observada uma relação proporcional entre a quantidade de DNC nos tecidos e a quantidade de nicarbazina na ração. Tanto nos animais alojados em cama como nos alojados em gaiola, o nível DNC no fígado ultrapassou o LMR (200 µg.Kg⁻¹) quando receberam ração contaminada com 4,2 e 13,5 ppm de nicarbazina. No músculo, as concentrações de resíduos de DNC não ultrapassaram o valor de LMR. Através de análise de regressão os autores observaram que níveis de DNC no fígado acima do LMR podem ocorrer quando os animais recebem ração com níveis de contaminação por nicarbazina acima de 2,4 ppm no período de retirada.

A Autoridade Europeia para Segurança em Alimentos (EFSA, 2010) divulgou um estudo, em que quatro grupos de frangos de corte (três fêmeas e três machos de 21 dias de idade) receberam ração com 125 ppm de nicarbazina durante sete dias consecutivos. Seis animais foram abatidos em três diferentes períodos de retirada (24 horas, cinco dias e 10 dias) e amostras de fígado, rins, músculo, pele e gordura foram coletados para pesquisa de resíduos por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa sequencial (LC/MS-MS). A presença de DNC foi observada em todos os tecidos pesquisados e nos três períodos de retirada, sendo observado no músculo com 24 horas, cinco e dez dias, nas seguintes concentrações 4.431 ± 571 µg.Kg⁻¹; 69,0 ± 16,0 µg.Kg⁻¹ e 2,0 ± 1,0 µg.Kg⁻¹, respectivamente.

Em outro estudo de depleção, utilizando frangos de corte, divulgado pela EFSA (2010) grupos de animais (três fêmeas e três machos) que receberam ração com 125ppm de nicarbazina durante 28 dias, foram abatidos com um, cinco, sete, nove, 11 e 14 dias de período de retirada do medicamento e amostras de fígado, rins, músculo, pele e gordura foram coletadas para a pesquisa de DNC por LC-MS/MS. A presença de DNC foi observada em todos os tecidos na coleta do primeiro dia e do quinto dia após a retirada do medicamento, com exceção dos rins. A partir do sétimo dia de coleta, todos os tecidos, exceto gordura e pele, apresentaram níveis de DNC abaixo do limite de quantificação (LoQ) ($25,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) do método. No músculo as concentrações observadas foram de $2.110 \pm 506 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e de $45,0 \pm 8,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ no 1º e no 5º dia, respectivamente.

3.3.2.2 Narasina

Em um estudo de depleção, utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), relatado pela EFSA (2004) quatro frangos de corte fêmeas e quatro machos foram alimentados com ração contendo 80 ppm de narasina durante cinco dias consecutivos. Em seguida, os animais foram abatidos para pesquisa de resíduos com zero, seis, 12 e 24 horas após a retirada da ração contendo o medicamento. Os resíduos de narasina foram eliminados rapidamente de todos os tecidos, com exceção da gordura, na qual a concentração mensurada foi de $28 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ após seis horas da retirada da ração. Após 12 horas, concentrações inferiores ao LoQ do método, de $25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, foram detectadas na gordura de alguns animais.

A EFSA (2004) publicou um estudo, no qual foram utilizadas 26 galinhas que receberam ração contendo 80 ppm de narasina. Em seguida, essas aves receberam uma dose única (equivalente a ingestão diária através da alimentação) de narasina marcada com C14. A narasina foi excretada rapidamente, e dentro de 48 horas, 85% da dose foi recuperada na excreta.

Olejnik et al. (2011), utilizando LC-MS/MS, avaliaram a presença de resíduos de nicarbazina e de narasina, em fígado e músculo do peito de galinhas de postura. As aves receberam durante 14 dias, ração contendo $79,3 \pm 6,82$ ppm de narasina e $86,2 \pm 7,74$ ppm de nicarbazina. Após os 14 dias de fornecimento, essa primeira ração foi retirada e grupos de três animais foram abatidos durante 22 dias. Uma segunda ração foi fornecida durante esse período, contendo contaminação acidental de $5,13 \pm 0,590$ ppm para narasina e níveis abaixo de 0,5 ppm para nicarbazina. No fígado, a DNC foi detectada durante todo o período analisado, com concentrações iniciais de $4.440 \pm 569 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e finais de $30,5 \pm 32,4 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. As concentrações de narasina, encontradas no fígado, logo no segundo dia, apresentaram valores próximos ao LoQ do método, de $1,13 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e não variaram significativamente durante todo o período de retirada, mantendo os valores médios de $1,65 \pm 1,14 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Nas amostras de músculo do peito, a DNC foi detectada, numa concentração de $415 \pm 47,6 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ no dia zero do período de retirada e em concentrações abaixo de $25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ após o segundo dia. Resíduos de narasina foram detectados no músculo de peito em uma concentração de $10,9 \pm 8,44 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ no primeiro dia de avaliação e, a partir do segundo dia, já apresentava valores abaixo do LoD ($0,21 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) do método.

3.3.2.3 Salinomicina

A distribuição de salinomicina nos tecidos de frangos de corte foi avaliada, por Atef et al., (1993). Os autores utilizaram 70 aves da linhagem Hubbard com idades entre 40 e 45 dias, que foram divididas em dois grupos de 35 animais. O primeiro grupo recebeu uma única dose de salinomicina, de 20 mg/kg de peso corporal, por gavagem e, o segundo grupo recebeu ração

contendo 60 ppm de salinomicina durante duas semanas. Cinco aves foram abatidas em cada grupo após duas, quatro, seis, oito, 24 e 48 horas da última administração, e foram coletadas amostras de músculo da coxa, músculo do peito, fígado, rins, gordura, coração e pele para a pesquisa de resíduos de medicamentos pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). A salinomicina foi rapidamente distribuída para todos os tecidos e nos animais que receberam a droga por gavagem, as concentrações foram mais altas quando comparado aos animais que receberam via ração. Nos animais que receberam a dose única por gavagem, os maiores teores de salinomicina foram encontrados no fígado ($2.300 \pm 90 \mu\text{g.kg}^{-1}$), seguido pelos rins ($2.100 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$), músculo da coxa ($1.900 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$), músculo do peito ($1.900 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$), gordura ($1.650 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$), coração ($1.300 \pm 70 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e pele ($90 \pm 30 \mu\text{g.kg}^{-1}$), com duas horas após o fornecimento da droga. As concentrações da salinomicina no músculo do peito e músculo da coxa, para os períodos de análise de duas, quatro, seis e oito horas após a retirada da ração foram, respectivamente, $1.900 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (na coxa e no peito), $900 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (na coxa e no peito), $600 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (na coxa e no peito), $200 \pm 30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (no músculo da coxa) e $170 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (no músculo do peito). Após 24 horas da retirada da droga não foi mais possível detectar resíduos de salinomicina no músculo do peito e da coxa, no coração e na pele, porém, resíduos da droga ainda foram encontrados na gordura após 48 horas do fornecimento do medicamento.

Os animais que receberam salinomicina pela ração também apresentaram as maiores concentrações de resíduos no fígado ($1.100 \pm 40 \mu\text{g.kg}^{-1}$), seguido da gordura ($900 \pm 30 \mu\text{g.kg}^{-1}$), coração ($700 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$), músculo da coxa ($680 \pm 20 \mu\text{g.g}^{-1}$), músculo do peito e rins ($670 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$), e pele ($380 \pm 30 \mu\text{g.kg}^{-1}$) com duas horas após a interrupção do fornecimento. As concentrações de resíduos no músculo do peito e da coxa com duas, quatro, seis e oito horas após a última administração foram, respectivamente, $680 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (músculo da coxa) e $670 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (músculo do peito), $370 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (para ambos), $150 \pm 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (para ambos), $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (no músculo da coxa) e $120 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (no músculo do peito). Após 24 horas de período de retirada, a salinomicina foi detectada somente no fígado, gordura e rins na concentração de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$, não sendo mais detectada após 48 horas. Os autores concluíram ser necessário no mínimo três dias de período de retirada para que não sejam detectadas concentrações prejudiciais da droga nos tecidos das aves abatidas.

Kennedy et al. (1995) ao avaliarem o tempo de depleção da salinomicina, utilizaram 40 frangos de corte machos, que receberam ração contendo 60 ppm da droga durante 14 dias. A depleção plasmática foi muito rápida, e dentro de 48 horas resíduos da droga não foram mais detectados ficando abaixo do LoD do método, de $0,16 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. No músculo e no fígado, as concentrações encontradas no último dia do tratamento (14º dia) foram de $2,5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $14 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectivamente, e a depleção completa no músculo foi observada no 2º dia após o período de retirada do medicamento, enquanto que a eliminação completa no fígado ocorreu após o 4º dia, quando os valores encontrados foram inferiores ao LoD do métodos, de $0,3 \mu\text{g.Kg}^{-1}$.

3.3.2.4 Monensina

Okada et al. (1980) realizaram um trabalho utilizando três grupos compostos de vinte aves. Cada grupo recebeu ração contendo diferentes níveis de monensina (80, 100 e 120 ppm) durante nove semanas. Cinco aves de cada grupo foram abatidas com 0, 24, 48 e 72 horas após a retirada da ração contendo o medicamento, e amostras de músculo, fígado, rins e gordura foram coletadas e analisadas por CCD. Resíduos de monensina foi detectado no tempo zero do período de retirada em todos os tecidos pesquisados, e não houve diferença estatística entre os tratamentos. A concentração de monensina encontrada no músculo no tempo zero do período de retirada variou

de 29 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ a 35 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Na coleta realizada 24 horas após a retirada do medicamento a presença de resíduos foi observada apenas na gordura, não sendo mais detectados resíduos em nenhum tecido nas coletas subsequentes.

A monensina sódica é absorvida de forma limitada (11-31%) e eliminada principalmente pelas fezes (99% depois de 48 horas) sendo que a excreção biliar representa 10 a 15% (EFSA, 2006). EFSA (2006) divulgou um experimento em que grupos de frangos de corte, compostos por três fêmeas e três machos, receberam ração contendo 125 ppm de monensina durante 35 dias e em seguida foram abatidos após zero, um, dois e quatro dias da retirada da ração medicada, para pesquisa de resíduos no fígado, rins, músculo, pele e gordura, por LC-MS/MS. Na coleta do dia zero do período de retirada, resíduos de monensina foram detectados em todos os tecidos, e a concentração encontrada no músculo foi de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Nas demais coletas, resíduos da droga foram encontrados apenas na pele e na gordura.

Chéneau et al. (2007) desenvolveram e validaram um método de LC-MS/MS, para avaliação da farmacocinética da monensina e determinação da concentração desse medicamento no plasma e em tecidos comestíveis de frangos de corte. Para verificação da aplicabilidade do método, 68 frangos de corte foram alimentados com ração contendo monensina na concentração de 121 ppm do primeiro ao 33º dia de vida. Após a retirada do medicamento da ração até o 36º dia, 6 a 10 animais foram abatidos em intervalos de tempo de duas horas para observar o período de depleção da monensina. Os resíduos de monensina declinaram rapidamente, e foram observadas durante 8 e 10 horas no plasma, fígado e músculo da coxa e permaneceram presentes na gordura por até 18h após a sua retirada da ração.

3.3.2.5 Semduramicina

Lynch et al. (1992) forneceram ração contendo 25 ppm de semduramicina a frangos de corte durante 44 dias. Seis animais foram abatidos com seis, 12, 18, 24, 36 e 48 horas após a retirada da ração contendo o medicamento e amostras de fígado foram coletadas para pesquisa de resíduos de semduramicina por HPLC. Resíduos da droga foram encontrados no fígado, nas concentrações de 166 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e de 17 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, após 6 horas e 24 horas da retirada da ração contendo a semduramicina, respectivamente.

O Comitê Científico sobre Nutrição Animal, da Comunidade Europeia divulgou um trabalho no qual frangos de corte receberam ração contendo 25 ppm de semduramicina durante sete dias e em seguida foram abatidos seis animais após seis, 12, 24, 48 e 120 horas da retirada da ração contendo o medicamento. Amostras de fígado, rins, músculo, pele e pele com gordura foram coletadas para a pesquisa de resíduos. O método utilizado não foi divulgado. Resíduos de semduramicina foram detectados em todos os tecidos e períodos analisados, e as maiores concentrações foram observadas no fígado. No músculo, as concentrações encontradas nos períodos avaliados (seis, 12, 24, 48 e 120 horas) foram de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, 7 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, 3 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, respectivamente (EC, 2002a).

O período de depleção da semduramicina foi avaliada em um estudo que utilizou 160 frangos de corte, sendo 80 machos e 80 fêmeas. Os animais foram alojados em quatro boxes, contendo 40 aves cada, de acordo com o sexo. Ração sem anticoccidiano (controle) foi fornecida para os animais de dois boxes durante todo o período experimental, sendo um boxe de fêmea e outro de macho. Os frangos de corte, machos e fêmeas, alojados nos outros dois boxes, receberam ração contendo 25 ppm de semduramicina, durante 42 dias. Após seis horas da retirada da ração

contendo o anticoccidiano, 12 machos e 12 fêmeas de cada tratamento foram abatidos para coleta de amostras de fígado. Após 12 e 18 horas, mais seis machos e seis fêmeas de cada grupo foram abatidos. As amostras foram analisadas por HPLC. As médias das concentrações de resíduos de semduramicina no fígado das fêmeas para os três períodos de coleta (6, 12, 18 horas), foram 77,8 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 48 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e 40,9 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, respectivamente, e para os machos os valores encontrados foram 155 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, 45,9 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e 38,3 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (Phibro, 2007).

3.4 Contaminação de ração com anticoccidianos

O uso de uma única linha para produção de rações para diversas espécies e categorias de animais é uma prática comum nas fábricas de ração. Essa situação possibilita a transferência de anticoccidianos de uma ração para outra, podendo ser fornecido a animais sensíveis e representar um risco a saúde humana devido à ocorrência de resíduos nos produtos de origem animal (Cannavan e Kennedy, 2000; Pietruk et al., 2015).

Sabendo que é inevitável a ocorrência de algum nível de contaminação, o Regulamento n° 08/2009 do Parlamento Europeu de 11/02/2009, estabeleceu limites máximos de contaminação cruzada de anticoccidianos em ração. Considerando a aplicação de boas práticas de fabricação, os valores de contaminação cruzada permitidos correspondem a 1% e 3% da concentração máxima de anticoccidianos, que pode ser adicionada à ração, para espécies sensíveis e espécies não alvo, respectivamente. A taxa de 1% também deve ser considerada para rações utilizadas durante o período que antecede o abate, para rações de animais que não recebem anticoccidianos e para rações de animais que produzem alimento continuamente, como vacas leiteiras e poedeiras. Na Tab.1 estão definidos os limites máximos de 1% e 3 % de contaminação cruzada para todos os anticoccidianos de uso permitido na União Europeia (EC, 2009).

Tabela 1 Limites máximos de 1% e 3% de contaminação cruzada de ração, para todos os anticoccidianos permitidos na Comunidade Europeia

| Anticoccidiano | 1% de contaminação cruzada (mg.kg^{-1}) | 3% de contaminação cruzada (mg.kg^{-1}) |
|-----------------------|--|--|
| Decoquinato | 0,400 | 1,200 |
| Diclazuril | 0,001 | 0,003 |
| Halofuginona | 0,030 | 0,090 |
| Lasalocida | 1,250 | 3,750 |
| Maduramicina | 0,050 | 0,150 |
| Monensina | 1,250 | 3,750 |
| Narasina | 0,700 | 2,100 |
| Nicarbazina | 0,500 | 1,500 |
| Robenidine | 0,700 | 2,100 |
| Salinomicina | 0,700 | 2,100 |
| Semduramicina | 0,250 | 0,750 |

Fonte:EC, 2009

McEvoy et al. (2003) investigaram alguns mecanismos de contaminação por nicarbazina em fábrica de ração. Três sequências de três toneladas de ração para limpeza da linha foram produzidas após a produção de ração contendo nicarbazina (125 ppm). Foram coletadas amostras do lote da ração de limpeza, em dois pontos da linha antes da peletização e em um ponto após a peletização. O estudo foi repetido em mais duas ocasiões. Antes da peletização, as maiores concentrações de nicarbazina (3,4 mg.kg^{-1}) foram observadas na primeira tonelada produzida após a ração com nicarbazina. Depois disso, as concentrações caíram nos lotes sucessivos. As amostras

coletadas após a peletização continham concentrações maiores de nicarbazina. Depois de oito toneladas produzidas, a concentração ($7,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) encontrada estava entre 10 ou 20 vezes maior do que as concentrações correspondentes coletadas logo após a etapa de mistura. A prática de retornar com material peneirado após a peletização para a etapa de pré peletização foi identificada como causa do problema. Mudanças como o não reencaminhamento do material peneirado, uma melhor segregação das rações contendo nicarbazina das que não possuem, pela separação da linha de mistura e a instalação de um novo elevador com um menor espaço morto (três ao invés de 15-20 kg) reduziram fortemente a incidência de ração contaminada com nicarbazina.

Um estudo realizado na Dinamarca, durante o período de 2004 a 2007, analisou 111 amostras de ração sem anticoccidianos que foram obtidas do primeiro lote produzido, logo após a fabricação de ração contendo anticoccidiano e a realização do procedimento de limpeza, para avaliação dos níveis de contaminação. Três amostras apresentaram contaminação com narasina nas concentrações de 0,015; 0,035 e $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$; em 13 amostras foi encontrado o anticoccidiano salinomicina, em concentrações variando entre 0,07 e $2,95 \text{ mg.kg}^{-1}$ e em duas amostras foi observada a presença de monensina nas concentrações de 0,034 e $2,46 \text{ mg.kg}^{-1}$ (EFSA, 2007; EFSA, 2008c; EFSA, 2008d).

Rokka et al. (2013) pesquisaram a ocorrência de anticoccidianos em amostras de ração coletadas no programa finlandês de controle de ração e em amostras obtidas em uma linha de produção de uma fábrica europeia com suspeita de ocorrência de contaminação cruzada. Lasalocida, maduramicina e semduramicina não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas por LC-MS/MS. Nas amostras do programa de controle, foram detectados resíduos de monensina e narasina em concentrações variando de, $<0,025$ a $0,73 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $<0,025$ a $1,6 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente. A salinomicina não foi detectada nas amostras do programa. Nas amostras obtidas na fábrica de ração, narasina foi detectada em duas rações para frango, nas concentrações de 16 mg.kg^{-1} e 17 mg.kg^{-1} , mesmo após a passagem de 2 ton. de ração sem o medicamento. A contaminação também foi observada na linha de mistura, porém as concentrações observadas foram menores que na linha de peletização. Depois de passar 3,2 ton. de ração sem medicamento, as concentrações de monensina na ração de frango, coletada na linha de mistura apresentaram valores mínimos inferiores a 0,025 e os valores máximo de $0,27 \text{ mg.kg}^{-1}$, enquanto a concentração de narasina variou entre 0,94 a $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. A salinomicina foi detectada tanto na linha de mistura quanto na linha de peletização na faixa de 0,025 a $0,027 \text{ mg.kg}^{-1}$, demonstrando, assim, a possibilidade de contaminação cruzada durante o preparo de um ração.

3.5 Legislação

Com a finalidade de proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio internacional de alimentos foi criado, em 1963, o *Codex Alimentarius*, programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS), que trata da normatização sobre alimentos. O Brasil tornou-se membro desse Programa na década de 1970 e, em 1980, foi criado o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCBA), com objetivo de participar dos comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e defender os interesses nacionais bem como a utilização de Normas *Codex* como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos (*Codex Alimentarius*, 2003).

No Brasil, o MAPA é o órgão responsável pela regulamentação e fiscalização de produtos e insumos agropecuários e, portanto, autoriza o uso controlado na ração dos anticoccidianos que

estão listados na Tab. 2 (Brasil, 2008). Na União Europeia, de acordo com o Regulamento nº1831/2003, os anticoccidianos licenciados como aditivos alimentares são o decoquinato, diclazuril, halofuginona, lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, nicarbazina, salinomicina, semduramicina e robenidina (EC,2003).

Tabela 2 Anticoccidianos autorizados no Brasil e seus respectivos teores permitidos na ração e o período de retirada

| Anticoccidiano | Teor permitido na ração | Período de retirada |
|------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Amprólio + etopabato | 250 | 5 |
| Clopidol | 125-250 | 5 |
| Clopidol + metilbenzoquato | 500 | 5 |
| Diclazuril | 1 | 5 |
| Robenidina | 33 | 5 |
| Narasina | 60-80 | 5 |
| Salinomicina (sódica) | 44-66 | 5 |
| Salinomicina + ácido 3-nitro | 500 | 5 |
| Lasalocida | 75-125 | 5 |
| Monensina (sódica) | 100-120 | 3 |
| Monensina + ácido 3-nitro | 500 | 5 |
| Maduramicina (amônio) | 5-6 | 5 |
| Nicarbazina | 125 | 10 |
| Nicarbazina + narasina | 80-100 | 10 |
| Nicarbazina + maduramicina | 500 | 10 |
| Nicarbazina + semduramicina | 500-600 | 10 |
| Semduramicina | 25 | 5 |
| Decoquinato | 20-40 | 3 |
| Halofuginona | 3 | 5 |

Fonte: Brasil, 2008.

A administração de medicamentos veterinários a animais de produção pode levar a presença de resíduos nos gêneros alimentícios provenientes de animais tratados, tornando necessária a estipulação de limites máximos para os resíduos das substâncias farmacologicamente ativas, de modo a facilitar a comercialização dos produtos de origem animal. O cumprimento do período de retirada tem como objetivo garantir que os alimentos não contenham resíduos em concentrações que excedam o limite máximo de resíduos (LMR) preconizado para cada droga (Reviere, 2011).

Esses limites são estabelecidos a partir de estudos toxicológicos de curto e médio prazo. Após a conclusão desses estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública analisam os resultados e, posteriormente, recomendam os LMRs de diferentes substâncias em diferentes alimentos (BRASIL, 1999). Para o *Codex Alimentarius*, a responsabilidade de realizar esses estudos é do Comitê Científico Internacional de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants), comitê científico composto por especialistas em aditivos e contaminantes; na União Europeia é a EMEA; no Brasil é o Ministério da Saúde (Dubugras e Pérez-Gutiérrez, 2008; Spisso, 2010). Os LMRs definidos pelo *Codex* e os referenciados pelas legislações do Brasil, dos EUA, da União Europeia e do Canadá, para os anticoccidianos utilizados como aditivos alimentares estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) para anticoccidianos definidos pelo *Codex*, referenciados pelas legislações do Brasil, dos EUA, da União Europeia e do Canadá

| Droga | Matrix | CODEX | BRASIL | EUA | UE | Canadá |
|---------------|--------------|-------|--------|-------|------|--------|
| Clopidol | Músculo | - | 5000 | 5000 | - | 5000 |
| | Fígado | - | - | 15000 | - | 15000 |
| | Rins | - | - | 15000 | - | 15000 |
| Decoquinato | Músculo | - | - | 1000 | - | 1000 |
| | Outros | - | - | 2000 | - | 2000 |
| Diclazuril | Músculo | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| | Fígado | 3000 | - | 3000 | 1500 | 3000 |
| | Pele/gordura | 1000 | - | 1000 | 550 | 1000 |
| | Rins | 2000 | - | - | 1000 | - |
| Lasalocida | Músculo | - | 20 | 60 | 20 | - |
| | Fígado | - | - | 300 | - | - |
| | Rins | - | - | 150 | - | - |
| | Pele/gordura | - | - | 300 | - | 350 |
| Maduramicina | Músculo | - | 240 | 240 | - | - |
| | Fígado | - | - | 720 | - | - |
| | Rins | - | - | - | - | - |
| | Pele/gordura | - | - | 480 | - | 400 |
| Monensina | Músculo | 10 | 10 | - | 8 | - |
| | Fígado | 10 | - | - | - | - |
| | Rins | 10 | - | - | - | - |
| | Gordura | 100 | - | - | - | - |
| Narasina | Músculo | 15 | 15 | 15 | 50 | 50 |
| | Fígado | 50 | - | 50 | - | - |
| | Rins | 15 | - | 15 | - | - |
| | Gordura | 50 | - | 50 | - | 500 |
| Nicarbazina | Músculo | 200 | 200 | 4000 | 4000 | 4000 |
| | Fígado | 200 | - | 4000 | - | 4000 |
| | Rins | 200 | - | 4000 | - | 4000 |
| | Pele/gordura | 200 | - | - | - | 4000 |
| Robenidine | Pele/gordura | - | - | 200 | - | 200 |
| | Outros | - | 100 | 100 | - | 100 |
| Salinomicina | Músculo | - | 100 | - | - | - |
| Semduramicina | Músculo | - | 50 | 130 | - | - |
| | Fígado | - | - | 400 | - | - |

FONTE: Brasil, 2014a; CODEX, 2015; GLOBAL MRL

Legenda: LMR Limite Máximo de Resíduos

3.6 Programas de monitoramento de resíduos em produtos de origem animal

No Brasil, existem dois programas nacionais de controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, o PNCRC do MAPA, e o Programa de Análise de Resíduos de

Medicamentos Veterinários em Alimentos expostos ao consumo (PAMVet) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 1999; Brasil, 2003).

O PAMVet foi criado com o objetivo de complementar as ações do MAPA e analisar alimento pronto para consumo adquirido no comércio. As amostras são coletadas em pontos de vendas pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais (VISAs) e enviadas aos laboratórios credenciados para análise; e, assim como o PNCRC, a amostragem segue o plano de amostragem do *Codex Alimentarius* (Brasil, 2003).

O PNCRC tem como função regulamentar básica, o controle e a vigilância de produtos de origem animal e suas ações estão direcionadas para conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou do LMR de substâncias autorizadas, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país. Para isso, são colhidas amostras de animais abatidos e vivos, de derivados industrializados e/ou beneficiados, destinados à alimentação humana, provenientes de estabelecimentos sob Inspeção Federal (Brasil, 1999).

Por imposição de países importadores, o governo brasileiro criou em 1986 o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), que, em 1999, passou a ser chamado de Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) e, a partir de 2007, de PNCRC. O objetivo do PNCRC é cuidar da melhoria da produtividade e da qualidade dos alimentos colocados à disposição da população brasileira e secundariamente, proporcionar ao país, condições de se adequar do ponto de vista sanitário às regras do comércio internacional de alimentos (Brasil, 1999).

O programa é composto por três subprogramas: o de monitoramento, o de investigação e o exploratório. O primeiro tem como objetivo gerar as informações sobre frequência, níveis e distribuição dos resíduos no país, ao longo do tempo. O segundo tem como meta investigar e controlar o movimento de produtos potencialmente adulterados, enquanto o último é desenvolvido em situações especiais, frente aos mais variados objetivos, tendo em comum o fato dos resultados das análises não serem utilizados para a promoção de ações regulatórias, nem conduzirem ao Subprograma de investigação (Brasil, 1999).

As amostras monitoradas pelo PNCRC são coletadas de acordo com o plano de amostragem recomendado pelo comitê do *Codex Alimentarius*, e o MAPA publica anualmente no Diário Oficial da União (DOU) o número de amostras previstas para serem analisadas. As amostras são coletadas por Fiscais Federais Agropecuários e encaminhadas aos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO), onde são analisadas. As análises de anticoccidianos em músculo de aves pelo PNCRC se iniciaram no ano de 2008 e um histórico dos resultados encontra-se no quadro 2. Durante os sete anos de análises, somente doze amostras apresentaram valores superiores ao LMR ($200 \mu\text{g.Kg}^{-1}$), para nicarbazina, e os níveis variaram de 291 a $867,67 \mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Quadro 2 Resultados das análises fiscais de anticoccidianos realizadas pelo MAPA em músculo de frangos de corte no período de 2008 a 2014

| Ano | Monensina | | Narasina | | Nicarbazina | | Salinomocina | | Semduramicina | |
|------|-----------|---|----------|---|-------------|---|--------------|---|---------------|---|
| | N | V | N | V | N | V | N | V | N | V |
| 2008 | 77 | 0 | 72 | 0 | 468 | 0 | 73 | 0 | NR | - |
| 2009 | 60 | 0 | 60 | 0 | 511 | 0 | 60 | 0 | NR | - |
| 2010 | 75 | 0 | 75 | 0 | 513 | 1 | 75 | 0 | NR | - |
| 2011 | 11 | 0 | 11 | 0 | 510 | 2 | 11 | 0 | NR | - |
| 2012 | 135 | 0 | 135 | 0 | 513 | 0 | 135 | 0 | 28 | 0 |
| 2013 | 511 | 0 | 511 | 0 | 511 | 2 | 511 | 0 | 511 | 0 |
| 2014 | 457 | 0 | 457 | 0 | 457 | 7 | 457 | 0 | NR | - |

NR: Não realizado, N: número de análises realizadas, V: número de amostras com resíduos acima do LMR, Fontes: Brasil, 2009; Brasil, 2010; Brasil, 2011; Brasil, 2012; Brasil, 2013; Brasil, 2014b; Brasil, 2015.

3.7 Métodos de detecção de resíduos em produtos de origem animal

Devido a necessidade de avaliar a conformidade dos produtos em relação aos valores de LMR estabelecidos e o uso ilegal de algumas substâncias, além da complexidade das matrizes, o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos e robustos assume grande importância. Os métodos biológicos de triagem têm sido largamente utilizados na investigação da presença de resíduos de medicamentos veterinários em várias matrizes, principalmente devido à simplicidade na execução, rapidez e geralmente baixo custo (Toldra e Reig, 2006). Esses métodos qualitativos ou semi-quantitativos são baseados, principalmente em técnicas imunológicas e microbiológicas. Entre as técnicas imunológicas, as mais comuns são o teste imunoenzimático (ELISA), o radioimensaio (RIA) e os biossensores (Silva, 2013). Os métodos físico-químicos, como a HPLC-MS/MS, são os mais indicados para pesquisa quantitativa e confirmatória de anticoccidianos em função de sua alta seletividade e, principalmente, alta sensibilidade.

3.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel e essas duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre elas de modo distinto. Os analitos fortemente retidos pela fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, conseqüentemente, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária. Essa retenção seletiva dos componentes da amostra pela fase estacionária é uma importante característica e resulta em migrações diferenciadas dos compostos de interesse. No caso da cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás e na cromatografia líquida é um solvente. Na cromatografia líquida, a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel (Penteado et al., 2008).

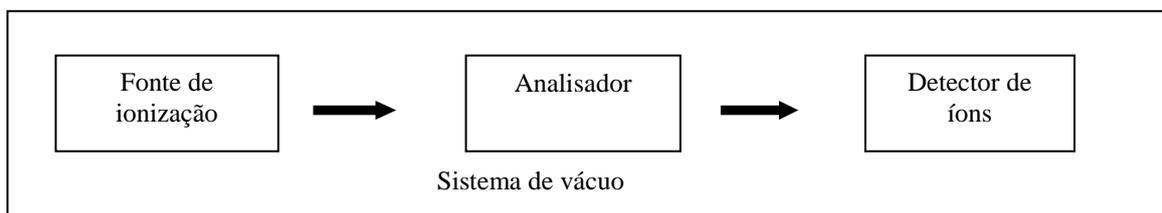
Na cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) é utilizada fase móvel sob alta pressão, o que permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica. O uso de partículas menores no recheio da coluna resulta em uma área superficial (o sítio de adsorção) maior, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Essa "miniaturização" das partículas da coluna permite o uso de colunas

menores, volumes menores de amostras e um gasto menor de fase móvel, sendo possível trabalhar na faixa de microlitros (μL) (Maldaner e Jardim, 2009).

O emprego da cromatografia acoplada à espectrometria de massas mostra-se vantajoso, uma vez que é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural a respeito do analito, assegurando assim a sua identificação com maior confiança do que quando ela é realizada apenas com base nas características de retenção das substâncias analisadas, como ocorrem nas outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, com a espectrometria de massas sequencial é possível detectá-los individualmente, desde que possuam diferentes massas molares ou gerem diferentes espectros de massas (Chiaradia et al., 2008).

A espectrometria de massa é uma técnica instrumental baseada na fragmentação de moléculas no estado gasoso por bombardeamento de feixe de elétrons. Essa fragmentação produz moléculas carregadas e o resultado é expresso na forma de espectros de massas. Basicamente, esse equipamento é composto por três componentes: fonte de ionização, analisador de massas e um detector de íons (Fig.5). Primeiramente, os analitos são ionizados na fonte de ionização, que pode ser do tipo: eletrospray (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI) entre outras. Em seguida, os íons formados são direcionados ao analisador de massas, que os separa conforme sua relação massa-carga (m/z) e/ou promove fragmentação dos mesmos. O fim do processo ocorre com a detecção dos íons e posterior formação do espectro de massas (Guerrera e Kleiner, 2005).

Figura 5 Componentes de um espectrômetro de massas: fonte de ionização, analisador de massas, detector de íons.



3.7.1.1 Fontes de ionização:

A ionização pelo processo eletrospray (ESI) permite a criação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo. Nesse processo, a amostra é dissolvida em um solvente, usualmente não polar, e pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são dessolvatadas) e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo. Apenas o processo de ionização ocorre à pressão atmosférica; a partir desse ponto, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo”. A ESI pode ser operada no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons, ocorrendo um processo de oxidação. De forma análoga, no modo negativo o oposto ocorrerá (Vékey, 2001; Smeraglia et al., 2002; Lanças, 2009).

Como a ESI ocorre diretamente no capilar, essa fonte de ionização pode ser utilizada para compostos sensíveis à temperatura, que podem ser ionizados sem sofrer degradação. Além disso, podem ser gerados íons com múltiplas cargas, o que permite sua utilização para compostos com massas molares relativamente grandes (Vékey, 2001).

Na técnica APCI, os analitos provenientes da coluna de cromatografia líquida são introduzidos na sonda (normalmente um tubo capilar o qual é circundado e continuamente lavado com um gás denominado gás auxiliar, como o N₂) cuja extremidade é circundada por um sistema de aquecimento, na qual é utilizado um gás nebulizador para volatilizar a amostra e o solvente (Lanças, 2009). O "spray" formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente, proveniente do sistema de HPLC, encontra-se em maior concentração no "spray" que o analito, esse é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre esses íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (Vékey, 2001; Smeraglia et al., 2002).

A APPI é muito semelhante à APCI, pois é constituída por um nebulizador aquecido que transforma o eluente da coluna cromatográfica em um "spray" e gera sua dessolvatação parcial. Entretanto, na APPI, ao contrário da corona de descarga utilizada na APCI, é empregada uma lâmpada UV com potência de 10,2 eV, cuja função é ionizar as moléculas do analito presentes nas gotículas do "spray". A ionização ocorre pela absorção de um fóton por uma molécula, seguida da ejeção de um elétron, formando um cátion do tipo M⁺. Este processo é denominado fotoionização direta (Bos et al., 2006).

3.7.1.2 Analisadores de massa

O efluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado é direcionado para o analisador de massas. A principal função do analisador de massas é separar, ou resolver os íons formados na fonte de ionização de acordo com a razão m/z . Os analisadores mais conhecidos são o quadrupolo, o de tempo de voo (do inglês: *time-off-flight*) (TOF), o de setor magnético (do inglês: *magnetic-sector*) e os de armadilha de íons (do inglês: *ion trap*). Esses analisadores possuem diferentes recursos, incluindo a faixa de razão m/z , a precisão e a resolução (Wents, 2010).

O analisador mais comumente utilizado em análises quantitativas é o quadrupolo, que é composto de quatro barras metálicas cilíndricas dispostas em dois pares, sendo um par de barras mantido em um potencial elétrico positivo e o outro par a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras. O par positivo de barras atua como um filtro para massas mais elevadas, enquanto o par negativo funciona como um filtro para massas menores. Os quadrupolos operam a uma resolução constante que é dependente da razão Rf/DC. Considerando-se uma dada amplitude para as voltagens Rf e DC, somente os íons que apresentarem determinada razão m/z , estarão em ressonância com o campo aplicado e irão passar pelas barras do quadrupolo e atingir o detector. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo (Lanças, 2009).

Os analisadores *ion trap* operam por princípios semelhantes ao quadrupolo. Porém, os íons não descrevem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, e sim são aprisionados dentro dele. Existe um campo elétrico no interior do *ion trap* que mantém os íons em uma órbita estável em

seu interior. Um potencial de Rf é aplicado e os íons são então desestabilizados e expelidos para fora do analisador, de acordo com seus valores de m/z (Wents, 2010).

Os analisadores tempo de voo baseiam-se no princípio de que íons com mesma carga têm energias iguais e a velocidade de cada íon será inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Logo, se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, forem acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas e eles atingirão o detector com “tempos de voo” diferentes (Wents, 2010).

O sistema de analisadores pode estar configurado no modo *tandem*. Nesse caso, tem-se mais de um analisador, geralmente dois, que podem ser do mesmo tipo ou não. Os analisadores são separados por uma cela de colisão dentro da qual há um gás inerte, em geral argônio ou xenônio, que irá colidir com os íons formados e selecionados gerando o espectro de massas (Wents, 2010).

O triplo quadrupolo é um instrumento constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (“collision-induced dissociation”) - DIC, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Chiaradia et al., 2008).

Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N_2), o que leva a um aumento na energia potencial desse íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Quando DIC é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H_2O , MeOH, CO, CO_2), dependendo da natureza do íon precursor.

Essa perda de fragmentos neutros é muito importante na determinação estrutural da molécula do analito, uma vez que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula. Quando DIC é realizada sob elevada energia, as reações de fragmentação geram informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode levar a uma fragmentação descontrolada. Além de informações estruturais, DIC pode melhorar a detectabilidade do método quando usada para gerar um íon característico de uma molécula e assim realizar sua detecção a partir desse íon fragmento quando a molécula do analito de interesse se encontra em presença de outras moléculas de mesma massa molar nominal, uma vez que reduz o ruído e aumenta a detectabilidade. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata. (Chiaradia et al., 2008).

3.7.1.3 Detectores

O detector tem a função de detectar e amplificar o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transferir o sinal para o sistema de processamento de dados. Os três principais tipos de detectores são fotomultiplicador, multiplicador de elétrons e microchannel plate (MCP) (Wentz, 2010).

No detector fotomultiplicador, o dinodo de conversão de alta voltagem converte íons positivos ou negativos em elétrons, que são em seguida convertidos em luz (fótons). O fotomultiplicador é

selado em um envelope de vidro, e assim é protegido de contaminação, o que faz com que seu tempo de vida seja mais longo (Schalley, 2000).

O multiplicador de elétrons é o detector mais utilizado nos espectrômetros atuais. Funcionam pela emissão de elétrons secundários produzidos por dinodos quando os íons provenientes dos analisadores se chocam contra eles. Potenciais mais altos nos dinodos de conversão são utilizados para acelerar íons de massas altas e assim melhorar a sensibilidade. (Schalley, 2000).

O MCP é um multiplicador de elétrons e consiste de capilares de vidros fundidos e cortados em uma placa fina. O MCP apresenta uma elevada eficiência de detecção de elétrons e íons (Schalley, 2000).

O detector depende do tipo de analisador, sendo o fotomultiplicador e o multiplicador de elétrons utilizados com analisadores quadrupolo e *ion trap* e apresentam faixa dinâmica ampla (10^5 - 10^8) enquanto que o MCP é utilizado com analisadores TOF e apresentam respostas extremamente rápidas, com alta sensibilidade (Diniz, 2011).

3.7.1.4 Modos de aquisição de dados

Os modos básicos de aquisição de dados para espectrometria em *tandem* são varredura “full scan”, espectro dos íons produzidos, varredura do íon precursor, perda do fragmento neutro e monitoramento de reações previamente selecionadas (SRM) (Wentz, 2010).

No modo de varredura “full scan” todos os íons presentes na amostra são selecionados no primeiro e no terceiro analisador, não havendo nenhum gás de colisão no segundo analisador (Greber e Singh, 2011).

No modo de espectro dos íons produzidos ou do íon “filho”, o primeiro analisador é utilizado para separar íons moleculares específicos, tais como $(M+H)^+$ ou $(M-H)^-$. Os íons escolhidos passam pela cela de colisão e são fragmentados pelo choque das moléculas com o gás ali presente, esses fragmentos são separados no segundo analisador de acordo com a razão m/z de cada fragmento. Como todos os íons gerados possuem o mesmo íon precursor selecionado anteriormente, tem-se o espectro de massas do composto de interesse. Esse tipo de experimento é especialmente útil no fornecimento de informações estruturais de moléculas orgânicas e para a geração de informações no sequenciamento de peptídeos (Greber e Singh, 2011).

No modo varredura do íon precursor ou do íon “pai”, o primeiro analisador permite a passagem de todos os íons da amostra, enquanto o segundo analisador é programado para monitorar fragmentos específicos, que foram gerados por determinados íon precursores. Esses fragmentos são previamente estabelecidos a partir do conhecimento do espectro de massas do íon precursor. Esse tipo de experimento é útil no monitoramento de grupos de compostos contidos numa mesma amostra e que produzem fragmentos em comum, por exemplo, hidrocarbonetos em uma amostra de óleo (Greber e Singh, 2011).

O processo de perda do fragmento neutro envolve os dois analisadores coletando dados em toda faixa de massas, sendo que o primeiro analisador seleciona uma faixa específica dos íons e o segundo analisador permite somente a passagem de fragmentos que diferem em um número de unidades de massas (equivalente a uma molécula neutra) dos íons transmitidos pelo primeiro analisador (Greber e Singh, 2011).

O SRM é utilizado para monitorar uma transição específica com alta sensibilidade. Nesse caso o primeiro analisador está configurado para selecionar íons com uma massa específica. A energia de colisão é otimizada para produzir o fragmento que será diagnosticado no segundo analisador. Somente íons procedentes da transição configurada podem ser detectados. O modo SRM é utilizado para a quantificação, em nível de traços, de analitos em mistura complexas. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, esse modo de varredura é denominado “monitoramento de reações múltiplas” (“multiple-reaction monitoring”) - MRM. Nesse modo o detector deve ser otimizado para o experimento de MRM, selecionando mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gerando um método confirmatório. O emprego dessa técnica fornece informações referentes às transições monitoradas, à retenção do composto na coluna e ao sinal proporcional à concentração do analito, tornando possível atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade, de acordo com os LMRs estabelecidos. Considerando que o detector de espectrometria de massas sequencial é um filtro de massas sequencial e que o sinal de uma determinada substância é monitorado pelo par de íons precursor/produto, pode-se em uma única corrida cromatográfica detectar vários compostos (Applied Biosystems, 2004; Martins et al., 2006; Greber e Singh, 2011). O monitoramento de pelo menos duas transições (par de íons precursor/produto) confere ao método analítico o número mínimo de pontos de identificação necessários para a confirmação de substâncias por espectrometria de massas sequencial de baixa resolução, conforme os critérios descritos na Decisão 2002/657/EC (EC, 2002b).

Dessa maneira, a análise de resíduos de medicamentos veterinários consiste num processo químico em que há extração dos resíduos de uma amostra, purificação do extrato e posterior detecção dos analitos. O avanço das técnicas analíticas provocou uma mudança significativa nos procedimentos para esse tipo de análise. No passado, existiam métodos complexos que eram capazes de analisar uma quantidade reduzida de substâncias, e na maioria das vezes, eram análises qualitativas (Brabander et al., 2009). Recentemente, foram desenvolvidos métodos que têm a capacidade de analisar multirresíduos, como por exemplo, o método publicado por Moloney et al. (2012) que permite a quantificação de 20 anticoccidianos (arprinocida, clopidol, decoquinato, diaveridina, etopabato, halofuginona, imidocarb, ladilomicina, semduramicina, lasalocida, monensina, maduramicina, narasina, salinomicina, robenidine, dinitrocarbanilida, toltrazuril, sulfóxido de toltrazuril, sulfato de toltrazuril, diclazuril) em ovos e em músculo de frango pela técnica UPLC-MS/MS.

A metodologia LC-MS/MS foi utilizada por muitos autores para a pesquisa dos diversos anticoccidianos nos produtos de origem animal, sendo considerada a metodologia de escolha devido a sua alta sensibilidade e especificidade. O método desenvolvido por Dubois et al. (2004) é capaz de mensurar resíduos de halofuginona, diclazuril, dinitrocarbanilida, robenidine, lasalocida, maduramicina, monensina, narasina e salinomicina em músculo de frangos de corte, na faixa de 0,1 a 0,6 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Outros pesquisadores obtiveram um LoQ de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para lasalocida, salinomicina, monensina, narasina e maduramicina em fígado e músculo de frangos trabalhando com método de cromatografia líquida com ionização por eletrospray acoplada ao espectrômetro de massa (LC-ESI-MS/MS) (Liang et al., 2009).

3.8 Presença de resíduos de anticoccidianos em produtos de origem animal

Alguns tecidos dos animais podem ser utilizados como matrizes para a pesquisa de resíduos de anticoccidianos, tais como os rins, o fígado, o músculo, a gordura e a pele (Kinsella, et al., 2009). 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.

Uma pesquisa realizada no Reino Unido entre 1995 e 2004, avaliou a presença de resíduos de narasina, salinomicina, monensina e nicarbazina em 7.409 amostras. Resíduos de narasina não foi detectado em nenhum produto, ao contrário da salinomicina que foi encontrada em sete produtos. Dois ovos de galinha de um total de 2.133 continham salinomicina nas concentrações de 15 e 20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; uma amostra de fígado de frango de corte, de um total de 1.837, na concentração de 30 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; uma amostra de fígado ovino, de um total de 1.765, na concentração de 4 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e em três amostras de fígado suíno, de um total de 128, com concentrações de 11, 15 e 20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Resíduos de monensina foi observado em 17 amostras de fígado de frango de corte, de um total de 2.205 amostras, com concentrações acima de 25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; em três amostras de fígado de ovino, dentre 3.077 analisadas, em concentrações acima de 56 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e em duas amostras de fígado bovino, de um total de 292, com concentrações acima de 11 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Para nicarbazina, 224 amostras de fígado de frango, de um total de 1.796, apresentaram concentrações acima de 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ com nível máximo de 7.200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; 123 amostras de ovos de galinha, de um total de 2.178, com concentrações acima de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, sendo o valor máximo encontrado de 900 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; 22 amostras de ovos de pato, em 97 analisadas, com valores entre 25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e 540 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; quatro amostras de carne de frango de um total de 514, com teores variando entre 25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e 110 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e em três amostras de patê de fígado, de um total de 120 analisadas, com concentrações variando de 40 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ a 70 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (EFSA, 2007; EFSA, 2008b; EFSA, 2008c; EFSA, 2008d).

Ovos, músculos e fígados de diferentes espécies animais foram analisados para a presença de resíduos de coccidiostáticos pelos Estados Membros da União Europeia, de acordo com os requerimentos da Diretiva EC 96/23 (EC, 2002b). Entretanto os resultados encontrados pelos Estados Membros diferiram significativamente em relação ao LoD e a definição de conformidade ou não da amostra. As concentrações nas quais os resultados foram definidos como não conforme não foram harmonizados dentro dos Estados Membros, mas vários países usaram 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ como limite de não conformidade para monensina, narasina, nicarbazina, salinomicina e semduramicina. Os resultados observados para nicarbazina, durante o período de 2004 e 2005, mostraram que 133 das 4.311 amostras de frangos coletadas, 23 das 3.314 amostras de ovos, uma de 340 amostras de carne de coelho e uma de 168 amostras de carne de caça foram consideradas não conformes. Os LoD variaram de 1 a 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (EFSA, 2008a). Para narasina nenhuma amostra apresentou resultado não conforme dentre as 12.084 amostras de diferentes tecidos analisadas (EFSA, 2007). Para salinomicina, 30 amostras foram consideradas não conformes dentre as 15.151 amostras analisadas, sendo 19 ovos de um total de 3.502, sete fígados de suíno, três amostras de fígado de frango e uma de fígado de coelho de um total de 6.902 amostras analisadas. Os LoD variaram entre 0,03 a 100 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (EFSA, 2008c). Das 14.120 amostras analisadas para pesquisa de resíduos de monensina, somente três amostras de fígado de frango estavam não conformes (10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$), porém as concentrações encontradas não foram divulgadas. Os LoD variaram entre 1 e 50 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (EFSA, 2008d). A semduramicina foi pesquisada em 300 amostras (100 ovos, 100 fígados de frango de corte e 100 fígados de ovino) somente no ano de 2005 e nenhuma delas apresentou valores considerados não conformes. O LoD usado foi menor que 1 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (EFSA, 2008e).

Na Bélgica foram analisadas 958 amostras de alimentos entre 2005 e 2006. Seis amostras de frango continham DNC acima do limite estabelecido de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, que foi definido na Bélgica. Das amostras analisadas, 12 amostras de frango, duas de ovos e uma de coelho continham

concentrações de DNC superiores ao LoD de 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ mas inferiores a 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, considerado como limite de não conformidade (EFSA, 2008b). Para monensina, cinco amostras de frango (sendo uma amostra de músculo), uma amostra de ovo, uma de músculo de cordeiro e uma de músculo de pato apresentaram concentrações maiores que o LoD (2 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$), porém abaixo do nível considerado não conforme (10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) (EFSA, 2008d).

Durante o período de 2003 a 2004, Danaher et al. (2008) realizaram uma pesquisa em toda a Irlanda, para verificar a ocorrência de resíduos de DNC no músculo do peito de frangos de corte. Foram analisadas 342 amostras produzidas na Irlanda e mais 217 importadas de indústrias da França, Holanda e Tailândia. Como método de triagem foi utilizado o teste do imunobiossensor, e as amostras com níveis de DNC acima de 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ foram submetidas a teste confirmatório por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV). Das 342 amostras produzidas na Irlanda, 26% apresentaram níveis de DNC entre 5 e 183 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, e nenhuma apresentou valor acima do LMR (200 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$). Entre as 217 amostras importadas 6% apresentaram níveis de DNC entre 2,7 a 18,7 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. De acordo com os autores, a diferença dos níveis de DNC encontrada entre os produtos do mercado interno e externo pode ser justificada pelo uso de produtos alternativos para o controle de coccidiose nos países que exportam para a Irlanda e/ou melhores práticas adotadas nas fábricas de ração e nas fazendas de produção avícola.

Kim et al. (2012) avaliaram a presença de narasina em 65 amostras de músculo de frango obtidas em mercados locais da Coréia, utilizando a metodologia de LC-MS/MS e não encontraram nenhuma amostra com concentrações de narasina superior ao com LoQ do método, de 5ng/g.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), localizada no município de Igarapé, Minas Gerais, no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) e no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG em 02 de dezembro de 2014 (número do protocolo: 300/2014).

4.1 Tratamentos

Durante a fase de criação das aves foram utilizados 720 pintos de um dia (360 fêmeas e 360 machos), da linhagem Cobb, alojados em 12 boxes de 10 m^2 , contendo cama de maravalha de madeira nova, gerando uma densidade animal de 6 aves/ m^2 . Ração e água foram fornecidos à vontade utilizando bebedouros e comedouros do tipo pendular. Para avaliar a presença de resíduos de anticoccidianos na musculatura do peito e da coxa dos frangos foram utilizados seis tratamentos, definidos de acordo com os medicamentos fornecidos às aves na ração.

- Tratamento A (Controle); ração sem adição de anticoccidiano, fornecida durante todo o período de criação (inicial até 21 dias de criação e crescimento até 41 dias de criação)
- Tratamento B (Nicarbazina): ração inicial contendo nicarbazina desde o alojamento até 21 dias de criação e mais 7 dias de ração sem adição de anticoccidiano;

- Tratamento C (Nicarbazina + Narasina); ração inicial contendo nicarbazina + narasina fornecida desde o alojamento até 21 dias de criação, ração crescimento contendo Nicarbazina + narasina até 28 dias de criação e mais 7 dias de ração sem adição de anticoccidiano;
- Tratamento D (Salinomicina): ração inicial contendo salinomicina até 21 dias de criação, ração de crescimento contendo salinomicina até 34 dias de criação e, ração final sem adição de anticoccidiano;
- Tratamento E (Semduramicina); ração inicial contendo semduramicina até 21 dias de criação, ração de crescimento contendo semduramicina até 34 dias de criação e, ração final sem adição de anticoccidiano;
- Tratamento F (Monensina); ração inicial contendo monensina até 21 dias de criação, ração de crescimento contendo monensina de até 34 dias de criação e ração final sem adição de anticoccidiano.

As rações contendo os anticoccidianos (Tab. 3) foram produzidas na fábrica da própria fazenda e o medicamento foi adicionado à ração e homogeneizado com auxílio de um misturador em “y” com capacidade de 100 Kg. Após a fabricação, as rações foram analisadas por LC-MS/MS para verificar a quantidade real de anticoccidiano presente. Para cada tratamento, foram utilizadas 120 aves, alojadas em dois boxes por tratamento, contendo 30 fêmeas e 30 machos em cada box. Com objetivo de minimizar as possíveis contaminações cruzadas entre as rações fornecidas, foram utilizadas conchas individuais para distribuição das rações de cada tratamento e sacos plásticos sobre as botas, para evitar a contaminação das camas.

Tabela 3. Composição das rações fornecidas aos frangos de corte para os tratamentos A(Controle), B(nicarbazina), C (nicarbazina + narasina), D (salinomicina), E (semduramicina) e F (monensina)

| Ingredientes | Inicial | Crescimento | Final |
|-----------------------------|---------|-------------|---------|
| Milho Grão | 57,75% | 63% | 63% |
| Farelo de soja 45% | 33,25% | 27,5% | 27,5% |
| Farinha de carne e osso 40% | 5,30% | 4,6% | 4,6% |
| Óleo de soja | 2,25% | 3,5% | 3,5% |
| Calcário | 0,35% | 0,2% | 0,2% |
| Sal comum | 0,35% | 0,4% | 0,4% |
| DL-metionina | 0,31% | 0,25 | 0,25 |
| L-Lisina HCL | 0,24% | 0,2% | 0,2% |
| Suplemento mineral | 0,05% | 0,05% | 0,05% |
| Cloreto de colina 60% | 0,05% | 0,05% | 0,05% |
| L-TREONINA | 0,04% | 0,05% | 0,05% |
| Enramicina | 0,01% | 0,01% | 0,01% |
| Inerte | 0,000 | 0,1% | 0,1% |
| TOTAL | 100% | 100% | 100% |
| Níveis Nutricionais | Inicial | Crescimento | Final |
| PB% | 22,5103 | 19,9436 | 19,9436 |
| Arginina Dig. Aves % | 1,4041 | 1,2195 | 1,2195 |
| Cálcio % | 0,9456 | 0,7948 | 0,7948 |
| Energ. Met. Aves Mcal/Kg | 3,0028 | 3,1476 | 3,1476 |
| Fósforo disponível % | 0,4506 | 0,4005 | 0,4005 |
| Gordura % | 5,4796 | 6,7328 | 6,7328 |
| Lisina Dig. Aves % | 1,2497 | 1,0773 | 1,0773 |
| Met. + Cist. Dig. Aves % | 0,8872 | 0,7713 | 0,7713 |
| Metionina Dig. Aves % | 0,6013 | 0,5129 | 0,5129 |
| Sódio % | 0,1948 | 0,1998 | 0,1998 |
| Treonina Dig. Aves % | 0,7689 | 0,6984 | 0,6984 |
| Triptofano Dig. Aves % | 0,2297 | 0,1979 | 0,1979 |

| Ingredientes | Inicial | Crescimento | Final |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Tratamento A- controle | Sem anticoccidiano | Sem anticoccidiano | Sem anticoccidiano |
| Tratamento B- nicarbazina | 125 ppm | Sem anticoccidiano | Sem anticoccidiano |
| Tratamento C- narasina/ nicarbazina | 50/50 ppm | 50/50 ppm | Sem anticoccidiano |
| Tratamento D- salinomicina | 66 ppm | 66 ppm | Sem anticoccidiano |
| Tratamento E- semduramicina | 20 ppm | 20 ppm | Sem anticoccidiano |
| Tratamento F- monensina | 120 ppm | 120 ppm | Sem anticoccidiano |

Para coleta das amostras dos músculos do peito e da coxa para análise de resíduos por HPLC-MS/MS, foram abatidas seis aves (três machos e três fêmeas) por tratamento a partir do 14º dia de criação e depois semanalmente até a retirada do anticoccidiano da ração. Para a avaliação do período residual, foram abatidas seis aves por tratamento após zero, um, dois, quatro e seis dias da retirada da ração contendo a medicação. As aves dos tratamentos com salinomicina, monensina e semduramicina, foram submetidas a um período de jejum de seis horas após a retirada da ração contendo os medicamentos (35 dias de criação) e em seguida foram eutanasiadas para a coleta de amostra para a pesquisa de resíduos das drogas. As amostras foram coletadas e mantidas congeladas a -20°C até o momento das análises. O quadro 3, resume os grupos de tratamento, ração, datas das eutanásias e número de aves eutanasiadas por tratamento.

Quadro 3 Tratamentos, rações fornecidas, número de animais eutanasiados, idade das aves no momento da eutanásia por tratamento.

| Idade das aves (dias) | | A Controle | | B Nicarbazina | | C Nicarbazina + Narasina | | D Salinomicina | | E Semduramicina | | F Monensina | |
|-----------------------|-------------------|---------------|---|------------------|---|--------------------------------|---|-------------------|---|--------------------|---|----------------|---|
| | | AE | R | AE | R | AE | R | AE | R | AE | R | AE | R |
| 01 | Ração inicial | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 02 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 03 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 04 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 05 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 06 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 07 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 08 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 09 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 10 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 11 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 12 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 13 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 14 | | 6 | A | 6 | B | 6 | C | 6 | D | 6 | E | 6 | F |
| 15 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 16 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 17 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 18 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 19 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 20 | | - | A | - | B | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 21 | Ração crescime | 6 | A | 6 | A | 6 | C | 6 | D | 6 | E | 6 | F |
| 22 | | - | A | 6 | A | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 23 | | - | A | 6 | A | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 24 | | - | A | - | A | - | C | - | D | - | E | - | F |

| Idade das aves (dias) | A Controle | | B Nicarbazina | | C Nicarbazina + Narasina | | D Salinomocina | | E Semduramicina | | F Monensina | |
|-----------------------|---------------|---|------------------|---|--------------------------------|---|-------------------|---|--------------------|---|----------------|---|
| | AE | R | AE | R | AE | R | AE | R | AE | R | AE | R |
| 25 | - | A | 6 | A | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 26 | - | A | - | A | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 27 | - | A | 6 | A | - | C | - | D | - | E | - | F |
| 28 | 6 | A | - | - | 6 | A | 6 | D | 6 | E | 6 | F |
| 29 | - | A | - | - | 6 | A | - | D | - | E | - | F |
| 30 | - | A | - | - | 6 | A | - | D | - | E | - | F |
| 31 | - | A | - | - | - | A | - | D | - | E | - | F |
| 32 | - | A | - | - | 6 | A | - | D | - | E | - | F |
| 33 | - | A | - | - | - | A | - | D | - | E | - | F |
| 34 | - | A | - | - | 6 | A | - | D | - | E | - | F |
| 35 | 6 | A | - | - | - | - | 6 | A | 6 | A | 6 | A |
| 36 | - | A | - | - | - | - | 6 | A | 6 | A | 6 | A |
| 37 | - | A | - | - | - | - | 6 | A | 6 | A | 6 | A |
| 38 | - | A | - | - | - | - | - | A | - | A | - | A |
| 39 | - | A | - | - | - | - | 6 | A | 6 | A | 6 | A |
| 40 | - | A | - | - | - | - | - | A | - | A | - | A |
| 41 | - | A | - | - | - | - | 6 | A | 6 | A | 6 | A |

Legenda: A- ração sem anticoccidiano. B- ração com nicarbazina, C- ração com nicarbazina + narasina, D- ração com salinomocina, E- ração com semduramicina; F- ração com monensina, R: tipo de ração, AE: número de aves eutanasiadas

4.2 Análises de resíduos de anticoccidianos

As amostras de músculo foram analisadas utilizando metodologia de HPLC/MS-MS validada por Barreto (2014).

4.2.1 Padrões, soluções e reagentes

Os padrões analíticos dos anticoccidianos nicarbazina (DNC), narasina (NARA), salinomocina (SALI), semduramicina (SEMD) e monensina (MONE) foram adquiridos da marca Sigma (Steinheim, Germany) e apresentaram grau de pureza mínima de 99%.

Para a construção da curva de calibração foi utilizado o método de padronização interna e os seguintes padrões internos: dinitrocarbanilida-D8 (DNC-d8) e o decoquinato-D5 (DECQ-d5) adquiridos da Witega (Berlin, Germany), foram utilizados.

Ácido fórmico, acetato de amônio e hexano grau HPLC utilizados foram da J.T. Backer (Phillisburg, USA). Acetonitrila (ACN), Dimetilsulfóxido (DMSO), Clorofórmio (CHCl) grau HPLC, foram adquiridos da marca Merck (Darmstadt, Germany). Água ultrapura obtida pelo sistema Milli-q (Millipore, Bedford, MA, USA) foi usada durante todo experimento.

Soluções estoques individuais dos anticoccidianos na concentração de 1 mg.mL⁻¹ foram preparadas dissolvendo 10 mg de cada padrão em solvente apropriado, utilizando balões volumétricos de 10 mL. Os solventes utilizados foram ACN para SALI e SEMD; metanol para NARA e MONE; DMSO para DNC, DNC-d8; ACN e clorofórmio para DECQ-d5. Soluções de

trabalho foram preparadas a partir da solução estoque em ACN, atingindo a concentração final de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para MONE; $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para NARA e; $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para SALI, SEMD e DNC. As soluções de trabalho dos padrões internos foram preparadas diluindo cada componente (DNC-d8 e DECQ-d5) em ACN e a concentração final obtida foi de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2.2 Extração das amostras

Para os procedimentos de extração foram pesados 2,0 g de cada amostra de músculo (peito e coxa homogeneizados) em tubos de centrifuga de 50 mL que foram adicionados de 10 mL de ACN e homogeneizados em Ultra Turrax® (IKA, USA). Depois da etapa de homogeneização, as amostras foram agitadas durante 20 minutos e posteriormente centrifugadas a $3890 \times g$ por 10 minutos a 5°C . Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos de polipropileno de 15 mL e submetidos a um processo adicional de purificação, sendo mantidos a -15°C por 60 minutos, para precipitação das proteínas, e novamente centrifugados a $3890 \times g$ por 20 minutos a 5°C . Os sobrenadantes obtidos desse processo adicional, foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL e evaporados sob fluxo de nitrogênio (N_2) a 45°C . Após a evaporação, foram adicionados aos tubos 2 mL de hexano e 2 mL do solvente de reconstituição (água: ACN, 1:1, v/v) que foram agitados a 80 rpm, durante 10 minutos. Em seguida 1 mL da fase aquosa foi transferido para um “vial” para injeção no sistema de HPLC-MS/MS. Como já era esperado encontrar concentrações elevadas de DNC nas primeiras amostras coletadas, uma etapa de diluição foi realizada durante o preparo dessas amostras, e, portanto, antes da etapa de secagem com N_2 , 20 μL das soluções foram transferidas para os “vials” juntamente com 980 μL do solvente de reconstituição. As amostras provenientes dos tratamentos, nos quais as aves receberam DNC foram analisadas diluídas e não diluídas.

As análises foram realizadas em sistema de HPLC Agilent série 1260 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo AB Sciex API 5500 QTRAP (AB Sciex, Foster City, CA, USA). A separação cromatográfica foi realizada usando a coluna Poroshell 120 EC-C18 ($3.0 \times 50 \text{mm} / 2.7 \mu\text{m}$) (Agilent, Milford, MA, USA) acoplada a pré coluna C18 (Phenomenex, CA, USA) à temperatura de 40°C . O volume de injeção foi de 4 μL e as fases móveis constituídas por água (fase móvel A) e ACN (fase móvel B), ambos com 0,05% de ácido acético e 1 mM de acetato de amônio. O fluxo foi de $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e um tempo de 2 minutos foi aplicado para condicionamento da coluna. O gradiente começou com 98% de A e diminuiu para 5% em 1 minuto, mantendo esse gradiente por 8 minutos e retornando à condição inicial aos 9 minutos, completando o ciclo com 10 minutos. O tempo de corrida total, considerando o tempo de equilíbrio da coluna, foi 12 minutos.

A resolução do espectrômetro de massa no monitoramento múltiplo de reação (MRM) foi unitária e o “*dwell time*” aplicado foi 50 ms. Os íons precursores selecionados foram $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ e $[\text{M}+\text{H}]^-$. O gás de colisão (CAD), o gás de nebulização (GS1), o gás de secagem (GS2) foram aplicados nas seguintes condições: 55 psi, 55psi e 20psi, respectivamente. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem no capilar no modo positivo 5,5kV e no modo negativo -4,5kV e temperatura da fonte 500°C .

Os fragmentos usados para a determinação em modo MRM do íon precursor e íons produto, o potencial de desagregação (DP), a energia de colisão (CE), o potencial de saída da célula de colisão (CXP) estão apresentados na Quadro 4.

Quadro 4 Transições MRM e as condições espectrométricas utilizadas para cada anticoccidiano pesquisado

| Droga | Padrão Interno | Íon Precursor | Íon Produto | DP(V) | EP(V) | CE(V) | CXP(V) | RT (min.) | |
|---------|----------------|---------------|-------------|--------|-------|-------|--------|-----------|------|
| DNC | DNC-d8 | 301,00 | 137,00 | -50 | -10 | -18 | -13 | 3,37 | |
| | | 301,00 | 106,80 | -55 | -10 | -50 | -15 | | |
| DNC-d8 | | 308,90 | 141,20 | -30 | -10 | -22 | -9 | 3,37 | |
| | | 308,90 | 111,00 | -75 | -10 | -50 | -9 | | |
| Decq-d5 | | Decq-d5 | 423,43 | 377,20 | 236 | 10 | 33 | 24 | 4,10 |
| | | | 423,43 | 205,00 | 236 | 10 | 55 | 16 | |
| MON | | | 688,30 | 635,20 | 76 | 10 | 21 | 8 | 5,45 |
| | | | 688,30 | 461,20 | 76 | 10 | 33 | 20 | |
| SAL | 768,36 | | 733,30 | 61 | 10 | 25 | 36 | 5,44 | |
| | 768,36 | | 715,20 | 61 | 10 | 33 | 30 | | |
| NAR | 782,39 | | 747,30 | 106 | 10 | 27 | 20 | 5,95 | |
| | 782,39 | | 729,30 | 106 | 10 | 31 | 14 | | |
| SEM | 890,36 | | 629,30 | 41 | 10 | 35 | 08 | 4,56 | |
| | 890,36 | | 647,30 | 41 | 10 | 27 | 18 | | |

Nota: MRM: Monitoramento Múltiplo de Reações; DP- potencial de desagregação; CE- energia de colisão; CXP*- potencial de saída da célula de colisão, que variou para as duas transições, em alguns analitos; V- volts; m/z- razão massa/carga, RT- tempo de retenção (minutos).

O método de HPLC-MS/MS utilizado para análise de anticoccidianos no músculo, apresentou LoQ de 12,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e LoD de 6,25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, para nicarbazina, salinomicina e semduramicina; LoQ de 2,5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e LoD de 1,25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para monensina e LoQ de 3,75 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e LoD de 1,87 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ para narasina.

4.3 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial, sendo seis tipos de ração utilizada e diferentes dias de avaliação, com seis repetições cada. O delineamento experimental gerou um total de 246 amostras para extração e análise por HPLC-MS/MS. Os resultados das concentrações dos analitos foram submetidos a análise estatística utilizando o teste de Kruskal Wallis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração de anticoccidianos nas rações

As rações produzidas para cada tratamento foram analisadas por HPLC-MS/MS com a finalidade de se determinar a quantidade fornecida de cada droga nas rações. Os resultados encontrados demonstraram que as concentrações dos anticoccidianos estavam de acordo com os valores calculados e adicionados na ração, demonstrando que o uso do misturador em “y” e o manejo realizado no preparo das rações foram adequados (quadro 5).

A ração do grupo controle para fase inicial apresentou traços de monensina e para fase de crescimento traços de monensina, salinomicina e semduramicina. A União Europeia, de acordo

com o Regulamento nº 08 de 2009, estabeleceu o valor correspondente a 1% da concentração máxima de cada anticoccidiano que pode ser adicionada à ração, como nível aceitável de contaminação para ração, caso ela seja destinada a animais que não receberão anticoccidianos ou para animais que estejam no período pré abate. Os valores de contaminação permitidos para monensina, salinomicina e semduramicina são 1, 250 ppm, 0, 700 ppm e 0, 250ppm, respectivamente.

Quadro 5 Quantidade em ppm de anticoccidianos utilizadas na produção de cada ração e a quantidade real fornecida após análise das rações por cromatografia.

| Tratamento | Ração Inicial | | Ração Crescimento | |
|----------------------------|--|--|--|--|
| | Quantidade adicionada no momento da produção | Quantidade detectada após análise da ração | Quantidade adicionada no momento da produção | Quantidade detectada após análise da ração |
| A- Controle | Sem anticoccidiano | Traços não quantificáveis de monensina | Sem anticoccidiano | Traços não quantificáveis de monensina, salinomicina e semduramicina |
| B- nicarbazina | 125 ppm | 125 ppm | Sem nicarbazina | Ausência de anticoccidiano |
| C-narasina/ nicarbazina | 50/ 50 ppm | 32/ 48 ppm | 50/ 50 ppm | 42/ 58 ppm |
| D- salinomicina | 66 ppm | 67 ppm | 66 ppm | 68 ppm |
| E- semduramicina | 20 ppm | 21 ppm | 20 ppm | 24 ppm |
| F-monensina | 120 ppm | 130 ppm | 120 ppm | 100 ppm |

5.2 Pesquisa de resíduos de anticoccidianos em músculo de frangos de corte

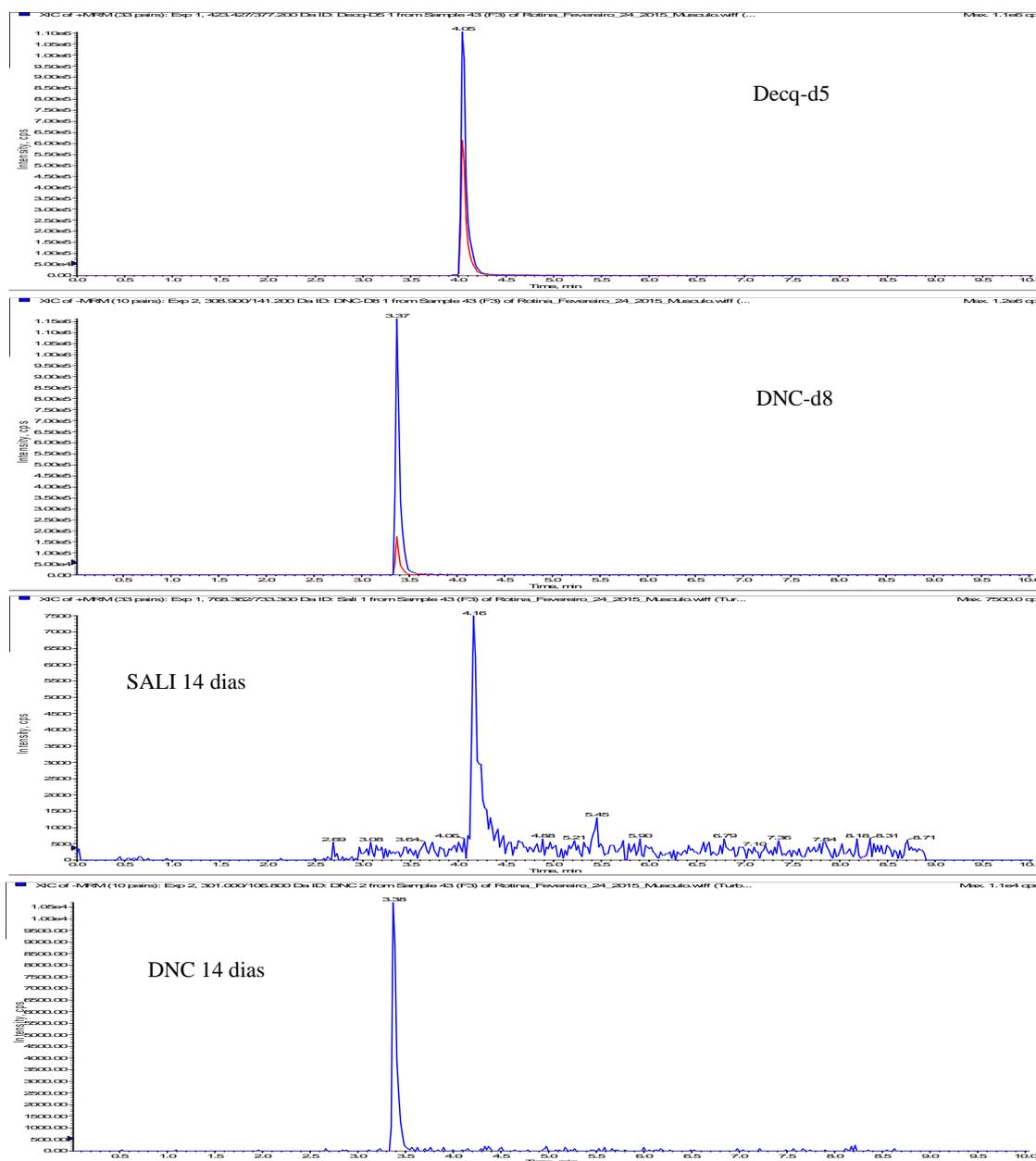
5.2.1 Grupo controle

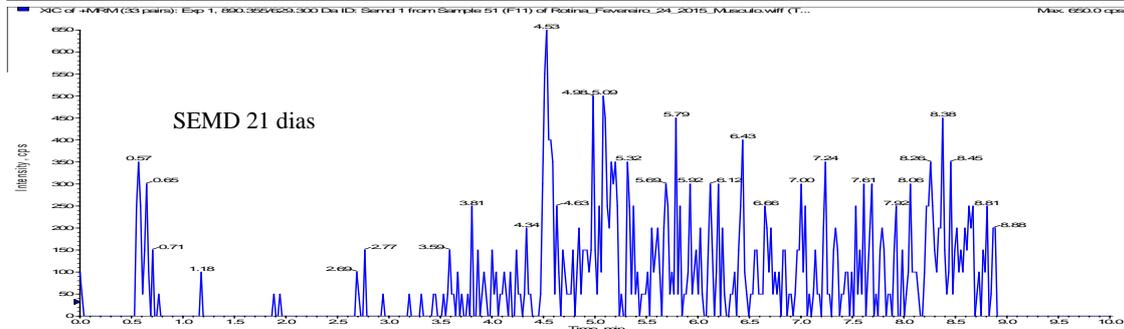
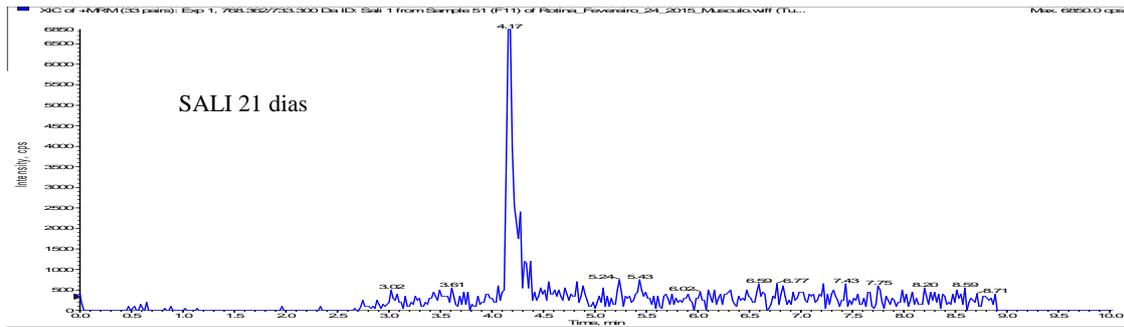
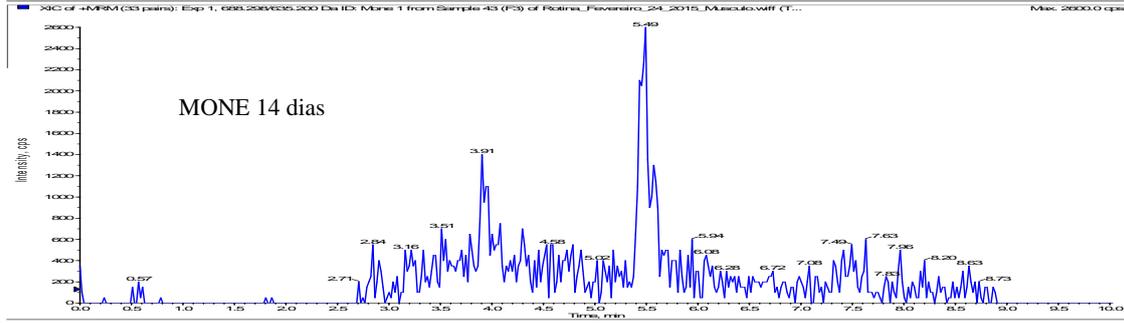
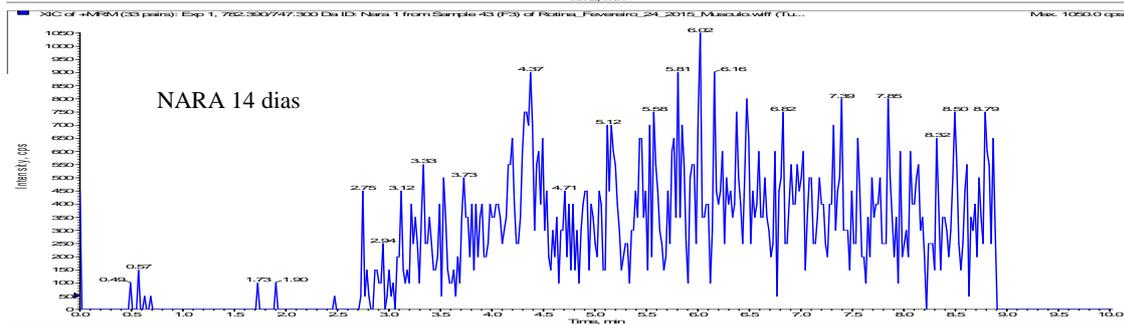
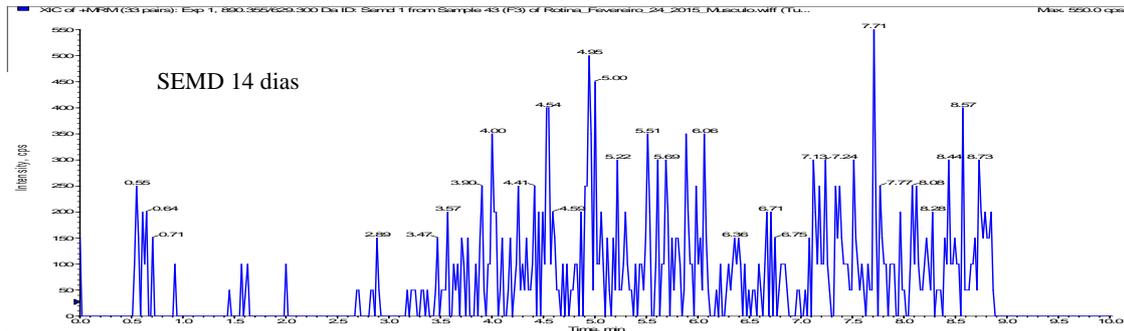
Nas análises da presença de resíduos de anticoccidianos no músculo da coxa e do peito, dos frangos de corte pertencentes ao grupo controle, não foi possível detectar a presença de nenhum dos anticoccidianos utilizados nos demais tratamentos, indicando que não houve contaminação significativa durante as etapas de fabricação da ração ou de tratamento dos animais. O método de HPLC-MS/MS é 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 m/z 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. A partir dos cromatogramas gerados, analisando os tempos de retenção de cada uma das drogas utilizadas, durante todo o período do experimento, as amostras do grupo controle não apresentaram picos detectáveis e nem mesmo quantificáveis, com o método utilizado que apresenta LoD de $6,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para salinomicina, nicarbazina e semduramicina, de $1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para monensina e de $1,87 \mu\text{g kg}^{-1}$ para narasina. Sendo, portanto, detectados somente os picos dos padrões internos, DNC-d8 no modo negativo e Decq- d5 no modo positivo (Fig.6)

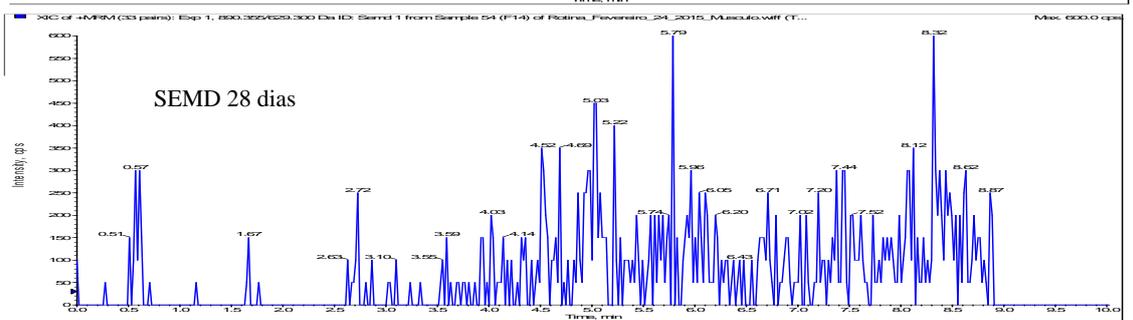
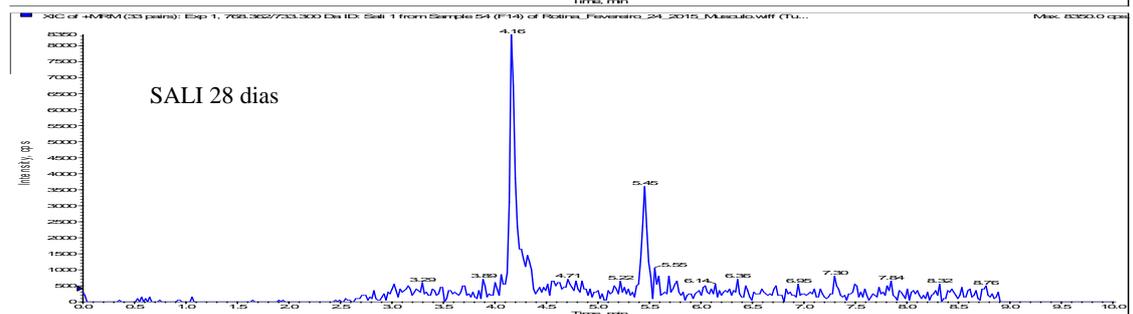
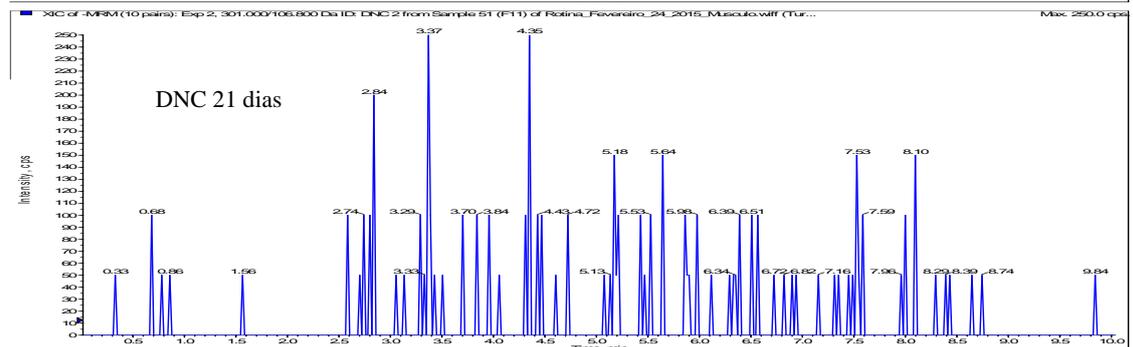
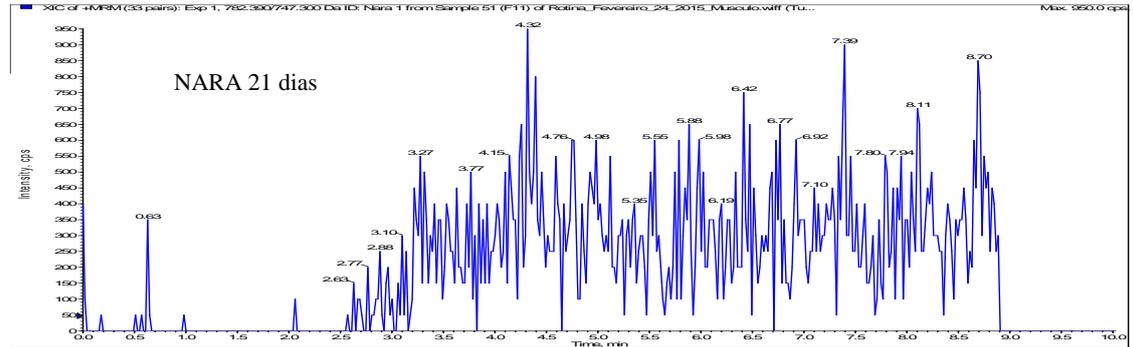
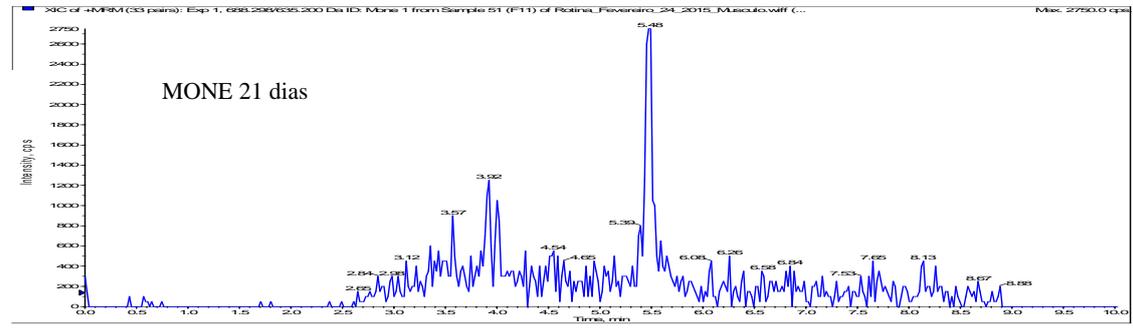
De acordo com Cannavan e Kenedy (2000) e Pietruk et al. (2015), a utilização de uma única linha de produção para a fabricação de diferentes rações pode levar a ocorrência de contaminação entre

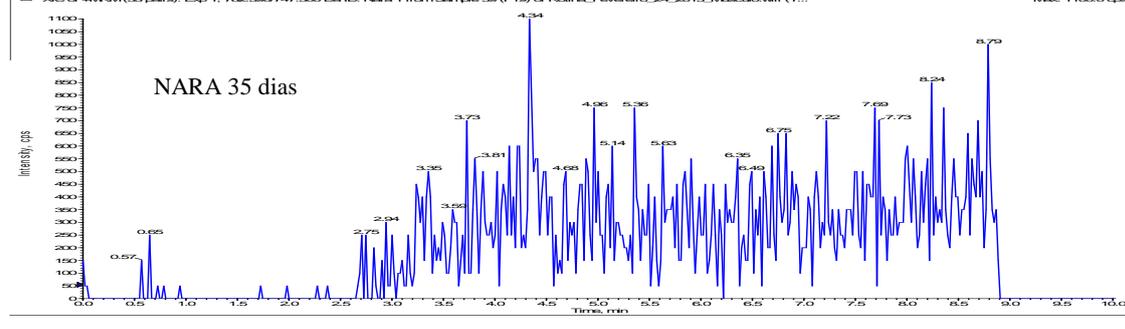
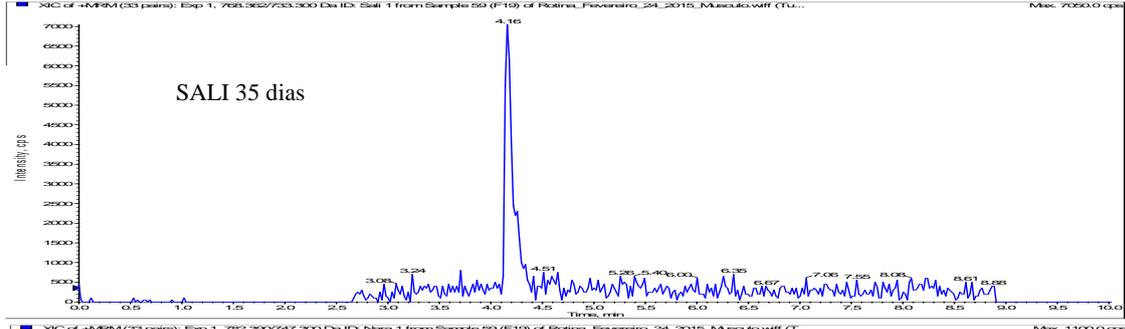
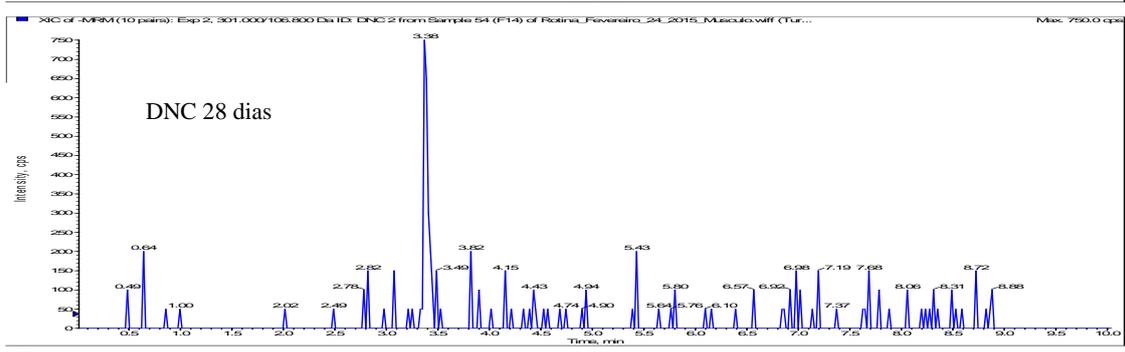
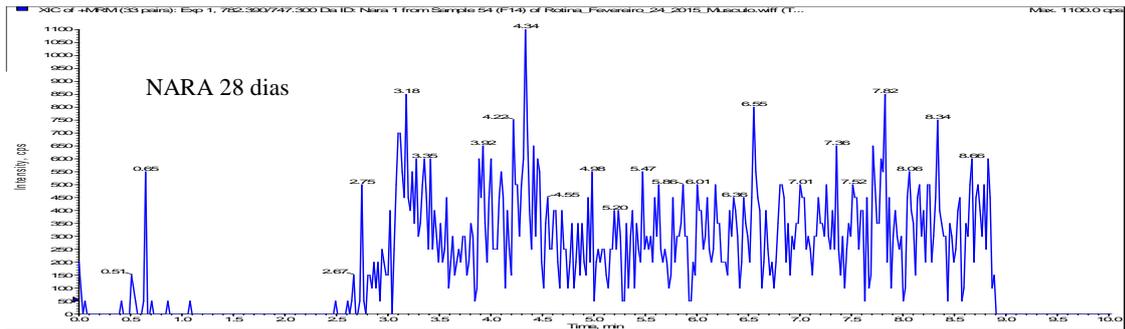
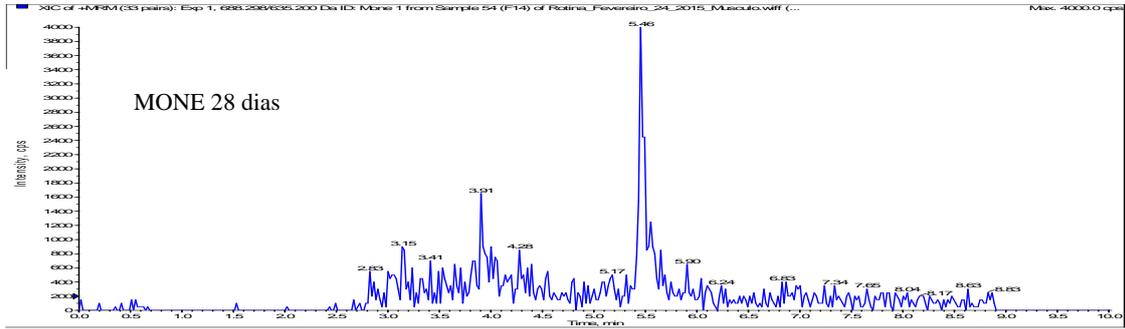
as rações. No presente trabalho, apesar ter sido utilizada a mesma linha de produção, a ração do grupo controle foi a primeira a ser produzida com objetivo de evitar esse tipo de contaminação. A presença de traços de anticoccidianos na ração fornecida ao grupo controle não foi suficiente para provocar a ocorrência de resíduos detectáveis no músculo dos animais que a receberam. Os cuidados durante a produção da ração associados ao manejo criterioso na criação dos animais utilizando sacos plásticos sobre as botas e uma única concha para cada ração durante o arrazoamento dos animais, contribuíram para que não ocorresse contaminação cruzada das rações e das camas, e, conseqüentemente, a presença de resíduos dos anticoccidianos no músculo.

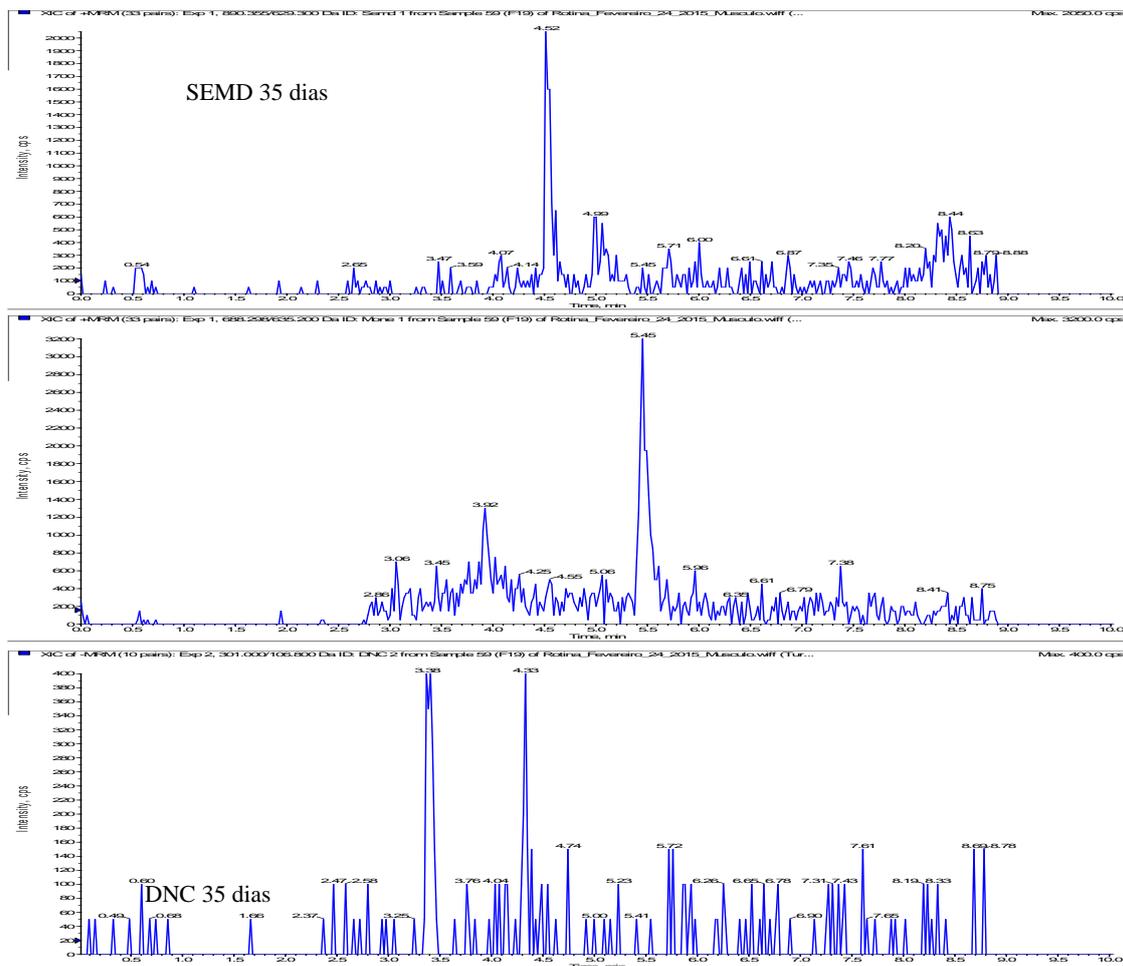
Figura 6 Cromatogramas dos padrões internos no modo positivo (Decq-d5) e negativo (DNC-d8), e dos analitos pesquisados, referentes as amostras de músculo de frangos de corte, pertencente ao grupo controle, coletadas nos dias 14, 21, 28 e 35











5.2.2 Nicarbazina

Os resultados encontrados para a pesquisa de resíduos de nicarbazina (DNC) no músculo do peito e da coxa dos frangos de corte encontram-se na Tab. 4. O LMR estabelecido para DNC na matriz músculo de ave é de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Brasil, 2014a; CODEX, 2015).

Tabela 4. Resultados das concentrações médias de resíduos de nicarbazina analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento com nicarbazina e de avaliação residual

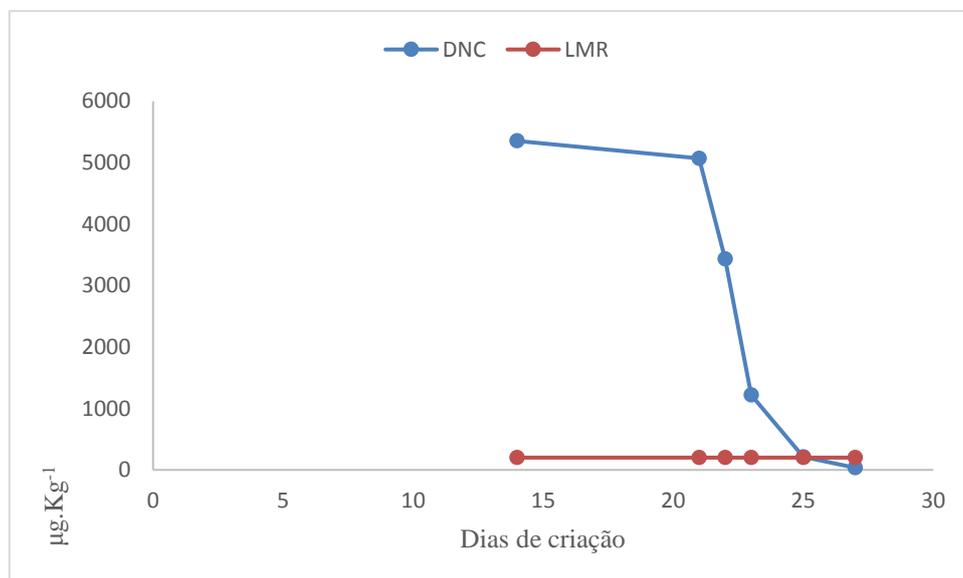
| Dia de abate | Concentração |
|--------------|--------------|
| 14 | 5353,33 a |
| 21 | 5070,00 a |
| 22 | 3431,67 a |
| 23 | 1220,17 a |
| 25 | 212,23 b |
| 27 | 34,80 b |

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

Na avaliação dos animais tratados com nicarbazina altas concentrações ($P < 0,05$) de resíduos de

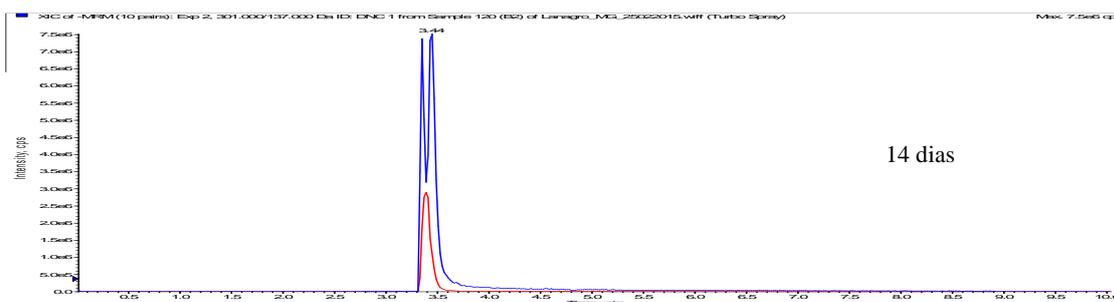
DNC foram detectadas durante os dias de tratamento e até dois dias após o término deste. No quarto dia após a interrupção do fornecimento da ração contendo a droga (25 ° dia de criação), os valores de DNC verificados foram menores ($P>0,05$), porém ainda se encontravam acima do LMR estabelecido pelo PNCRC. No 27° dia de criação, seis dias após a retirada da droga, as concentrações de DNC já se encontravam bem abaixo do LMR (Fig.7). A queda na concentração de DNC no músculo observada a partir da terceira coleta pode ser justificada pela retirada da ração contendo o medicamento. A nicarbazina mostrou ser uma droga muito absorvida e que deixa altas concentrações de DNC no músculo durante seu fornecimento e apresenta uma queda acentuada dessas concentrações após a sua interrupção.

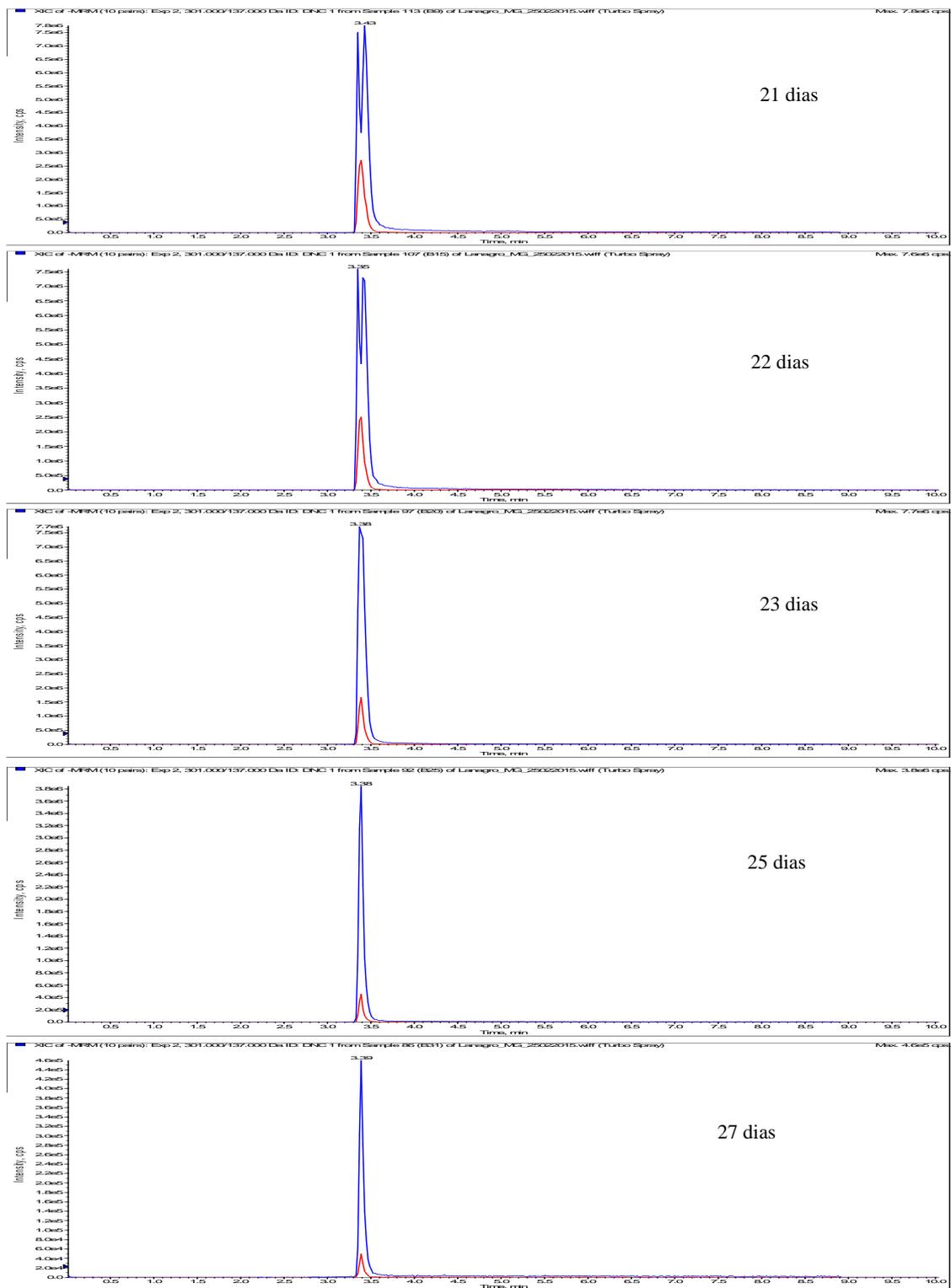
Figura 7 Concentrações médias de DNC x LMR, analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante o período de tratamento com nicarbazina e durante a avaliação residual.



A Fig.8 ilustra os cromatogramas gerados pelas análises das amostras de músculo da coxa e do peito dos animais tratados com nicarbazina. Foram observados picos cromatográficos contendo as duas transições no tempo de retenção esperado para DNC em todas as coletas e, dessa forma a presença dos resíduos foi confirmada e quantificada.

Figura 8 Cromatogramas referentes as amostras de músculo de frangos de corte, coletadas nos dias 14, 21, 22, 23, 25 e 27 dos animais tratados com nicarbazina





A EFSA (2010) divulgou um estudo que objetivou avaliar o período residual da nicarbazina na musculatura de frangos de corte. Foram utilizados frangos de corte tratados com 125 ppm de

nicarbazina na ração durante 28 dias. Os animais foram abatidos com um, cinco, sete, nove, 11 e 14 dias após a retirada do medicamento da ração e amostras de fígado, rins, músculo, pele e gordura foram coletadas para a pesquisa de DNC por LC-MS/MS. Foi observado a concentração de DNC na musculatura de $4.431 \pm 571 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ no primeiro dia, após a interrupção do fornecimento da droga, e $69 \pm 8 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ no quinto dia, demonstrando que o período de retirada de cinco dias foi suficiente para que as concentrações de DNC na musculatura caíssem abaixo do LMR. Portanto, de acordo com os dados do presente trabalho e com os relatados por EFSA (2010), a nicarbazina apresenta uma rápida metabolização, sendo seis dias de período de retirada suficiente para não serem observados valores acima do LMR, com isso o período de 10 dias, recomendado pela legislação brasileira (Brasil, 2008) excede o prazo realmente necessário.

A utilização de nicarbazina leva ao aumento do débito cardíaco e queda na taxa respiratória, podendo causar morte por estresse calórico, quando os animais são mantidos em temperaturas elevadas, não sendo indicada sua utilização durante a fase de crescimento (Beers et al., 1989; Wiernusz e Teeter, 1995). Essa restrição da droga na fase de crescimento contribui para que seus resíduos sejam eliminados antes do período de abate, o que pode justificar os resultados encontrados no PNCRC durante os anos de 2008 a 2014, em que somente 0,34% das amostras analisadas apresentaram resíduos de DNC no músculo de frangos de corte. Porém deve-se atentar para a possibilidade de erro de manejo durante o fornecimento da ração o que provavelmente poderia justificar as amostras de músculo com a presença de DNC em níveis de 291 a $867 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, encontradas no PNCRC.

Na Europa, as aves são criadas em galpões climatizados, permitindo o uso da nicarbazina por períodos mais longos, o que seria mais uma justificativa, além da ocorrência de erro no manejo do fornecimento das rações, para as amostras com presença de resíduos de DNC. No Reino Unido, 0,8% das 519 amostras de carne de frango apresentaram valores entre 25 e $110 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Na Europa de um montante de 4.311 amostras de carne de frango 133 (3.1%) apresentaram valores acima de $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e na Bélgica entre 958 amostras, somente seis (0,6%) tiveram níveis acima de $10 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (EFSA, 2008b). Danaher et al. (2008), avaliaram os níveis residuais de nicarbazina em carcaças de frangos de corte criados na Irlanda e exportadas para aquele país e não encontraram nenhum resultado, das 559 amostras analisadas, com valores acima do LMR para a droga.

5.2.3 Narasina + Nicarbazina

Os resultados encontrados para a pesquisa de DNC no músculo da coxa e do peito dos frangos de corte, que receberam ração contendo nicarbazina + narasina, encontram-se na Tab. 5. O LMR estabelecido para DNC na matriz músculo de ave é de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Brasil, 2014a; CODEX, 2015). Assim como observado no tratamento B (125ppm de nicarbazina/ 21 dias), na avaliação dos animais tratados com nicarbazina + narasina, altas concentrações ($P < 0,05$) de resíduos de DNC foram detectadas durante todo o período de tratamento e por mais dois dias após a interrupção. No quarto dia após o término do tratamento das aves (32 dias de criação), os valores de DNC verificados foram menores ($P > 0,05$) e estavam abaixo do LMR estabelecido pelo PNCRC (Fig. 10). Os níveis de DNC detectados nos três primeiros dias de coleta (14º, 21º e 28º dias de criação) foram muito próximos ($2866 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $2748 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $2288 \mu\text{g.Kg}^{-1}$), e a queda nos dias subsequentes pode ser justificada pela retirada da droga no dia 28. No sexto dia após a interrupção do tratamento, resíduos de DNC não foram mais detectados no músculo dos animais tratados. O comportamento da nicarbazina no organismo das aves tratadas com nicarbazina + narasina foi semelhante ao observado nos animais do tratamento B (125 ppm de nicarbazina), diferindo apenas na concentração residual de DNC detectado no músculo. Devido ao sinergismo entre a

nicarbazina e narasina, houve redução da dose de nicarbazina (50ppm) para menos da metade da dose do tratamento B, justificando, portanto, os menores níveis de DNC encontrados na musculatura dos animais tratados com nicarbazina + narasina.

Tabela 5 Resultados das concentrações médias de resíduos de DNC analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, durante o período de tratamento com nicarbazina + narasina e durante a avaliação residual.

| Dias de análise | Médias das concentrações ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) |
|-----------------|--|
| 14 | 2863,33 a |
| 21 | 2748,33 a |
| 28 | 2288,33 a |
| 29 | 1103,83 a |
| 30 | 418,66 a |
| 32 | 35,63 b |
| 34 | ND b |

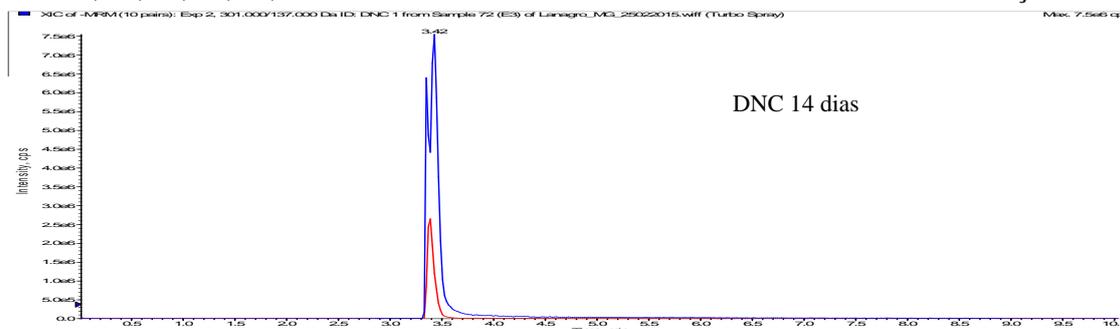
Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis ($P < 0,05$).
ND: não detectado ($< 6,25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$).

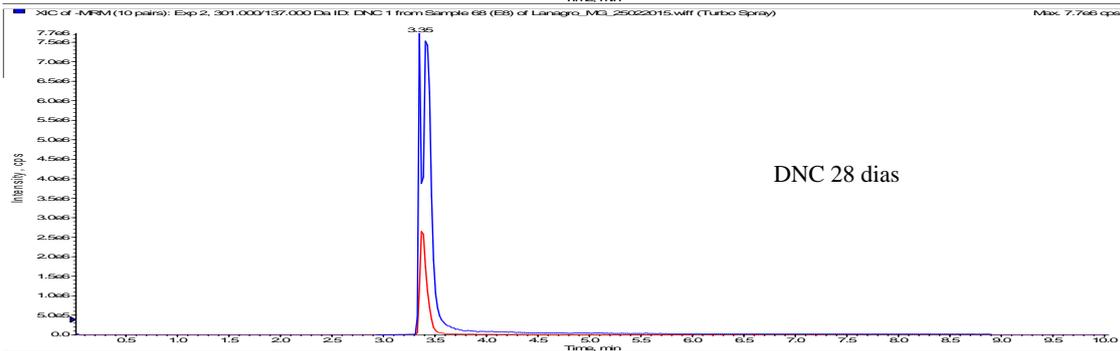
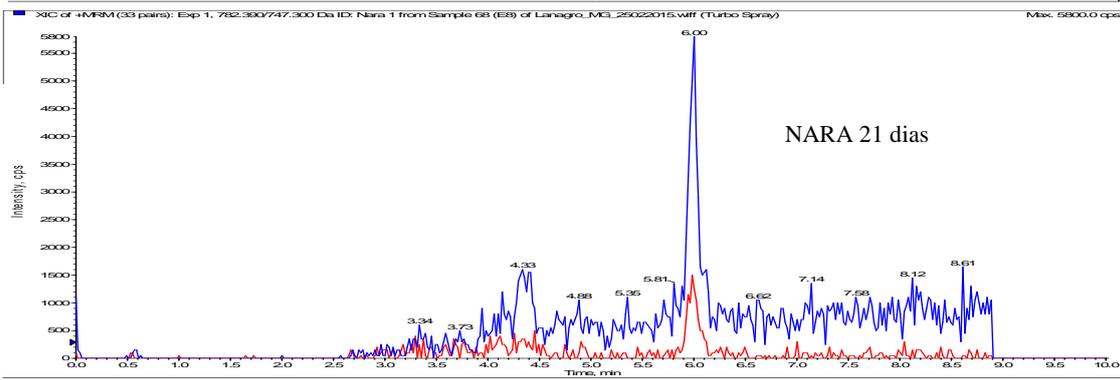
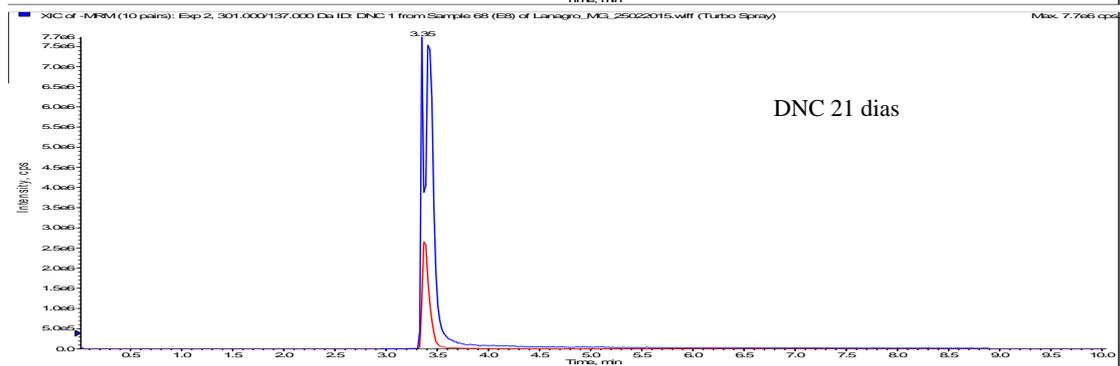
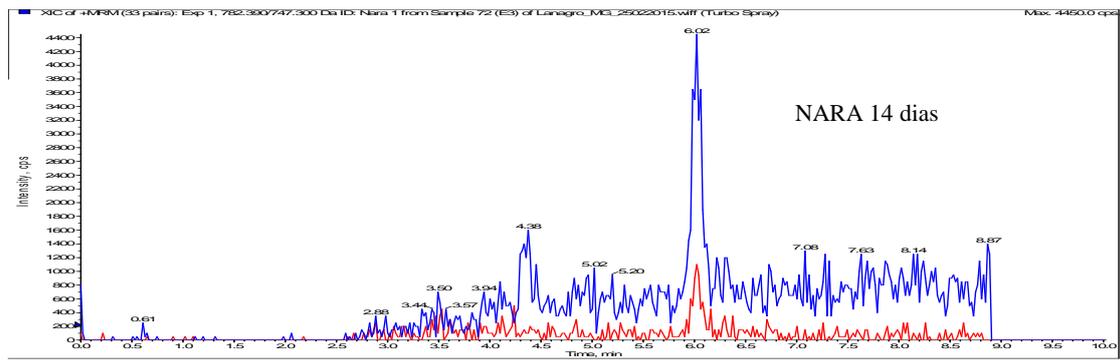
Foram observados picos cromatográficos (Fig. 9) contendo as duas transições no tempo de retenção da nicarbazina e da narasina em todas as coletas, e dessa maneira a presença de DNC foi confirmada e quantificada. Para narasina, a quantificação (LoQ: $3,75 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) só foi possível em cinco amostras (11,9%) e a detecção (LoD: $1,87 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) em mais seis amostras (14,3%) dentre as 42 analisadas, durante todo experimento. Todos os valores quantificados (Tab.6) para narasina estavam abaixo do LMR ($15 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) estabelecido para narasina na matriz músculo de ave (Brasil, 2014a; CODEX, 2015).

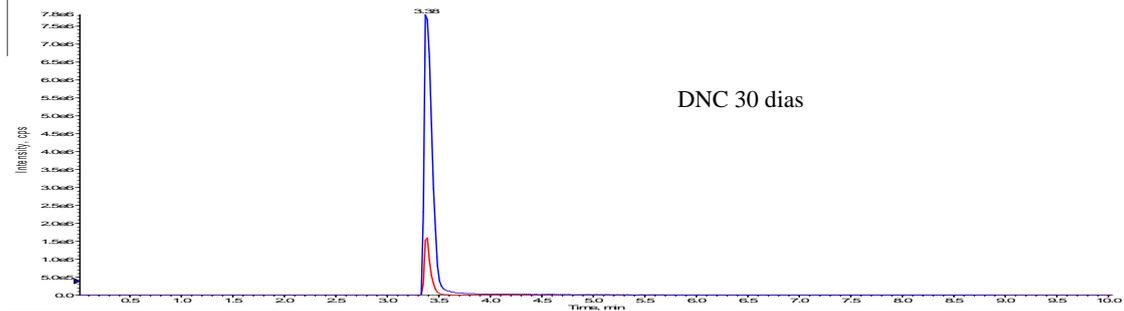
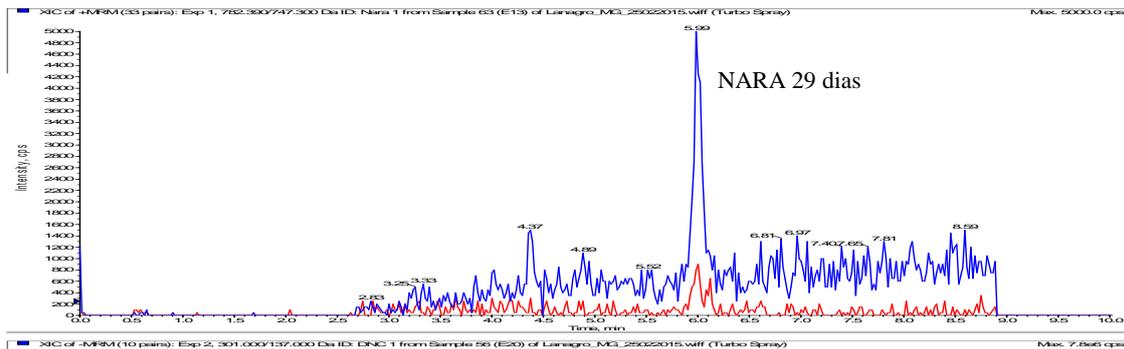
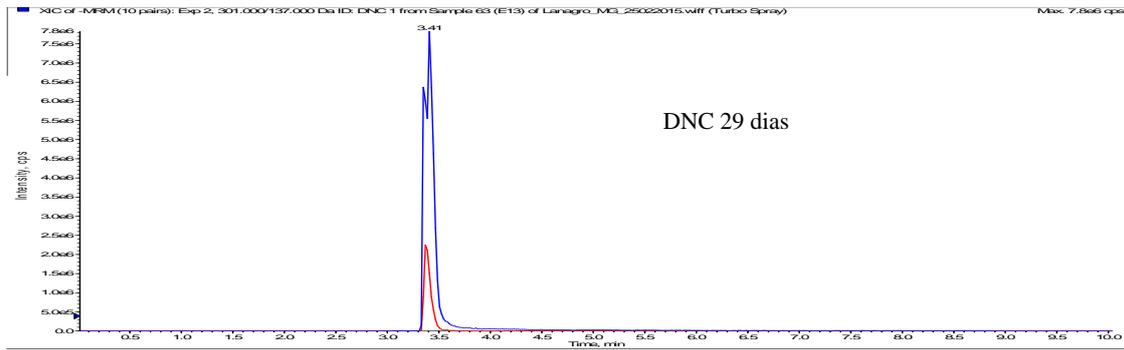
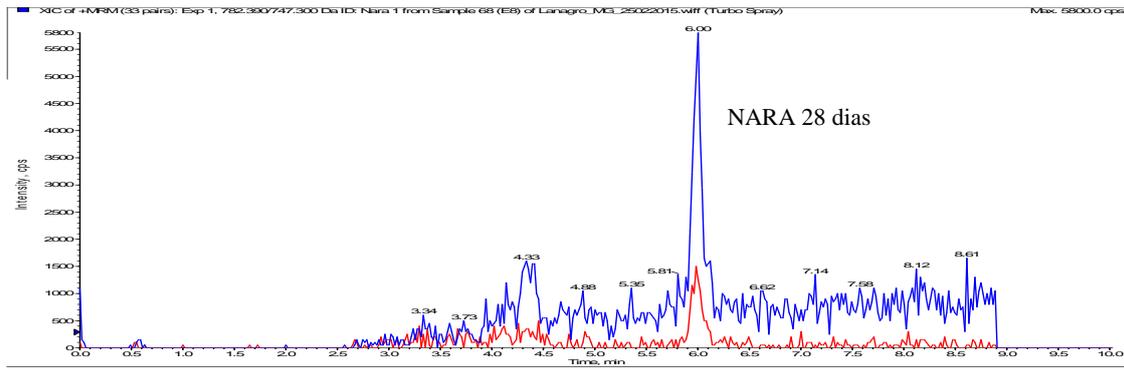
Tabela 6 Resultados quantificáveis de resíduos de narasina analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, durante o período de tratamento com nicarbazina + narasina e durante a avaliação residual.

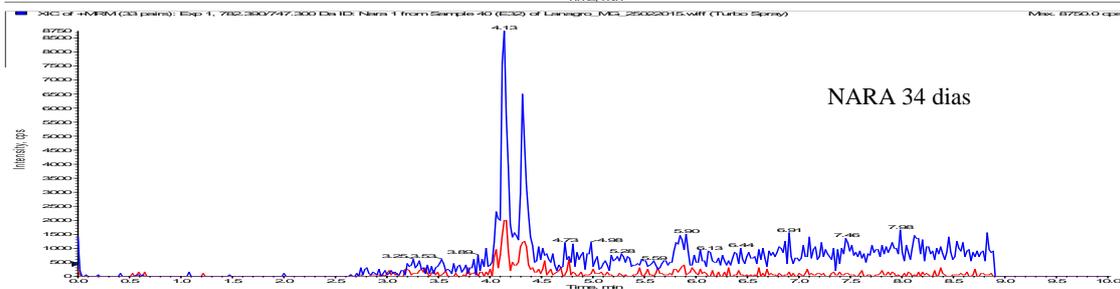
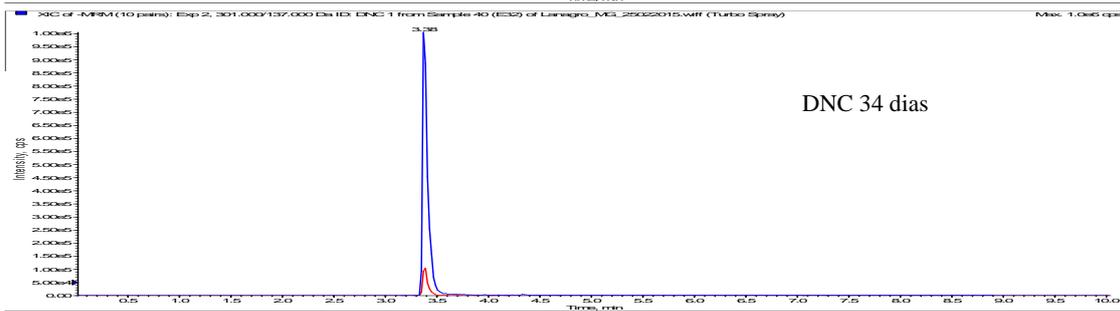
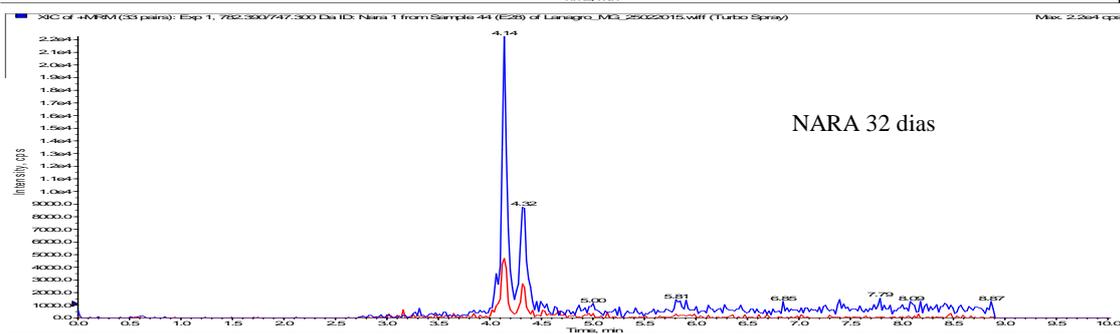
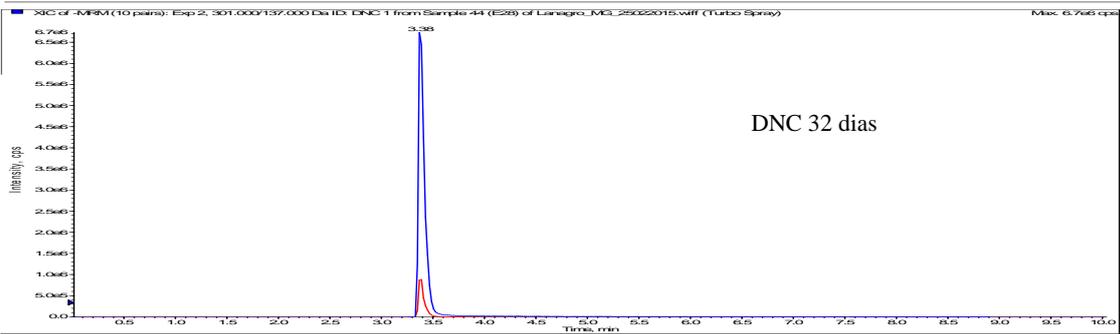
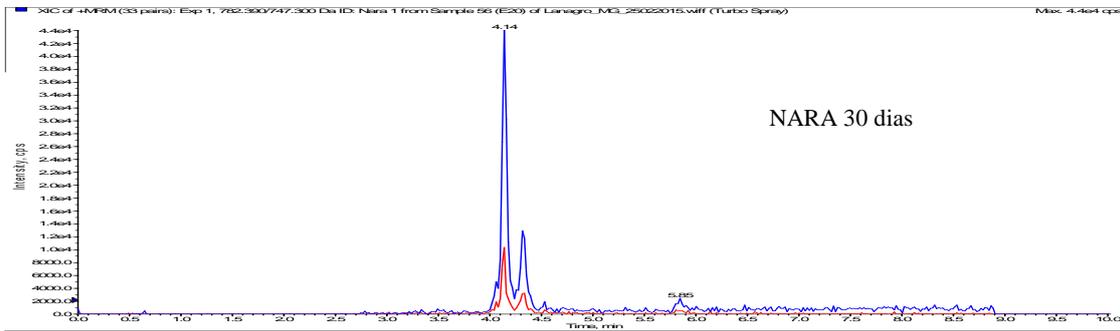
| Dia de criação | Concentração de Narasina ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) |
|----------------|--|
| 21° | 3,78 |
| | 4,32 |
| 28° | 5,81 |
| 29° | 3,78 |
| 30° | 3,51 |

Figura 9 Cromatogramas referentes as amostras de músculo de frangos de corte, coletadas nos dias 14, 21, 28, 29, 30, 32 e 34 dos animais tratados com nicarbazina + narasina na ração







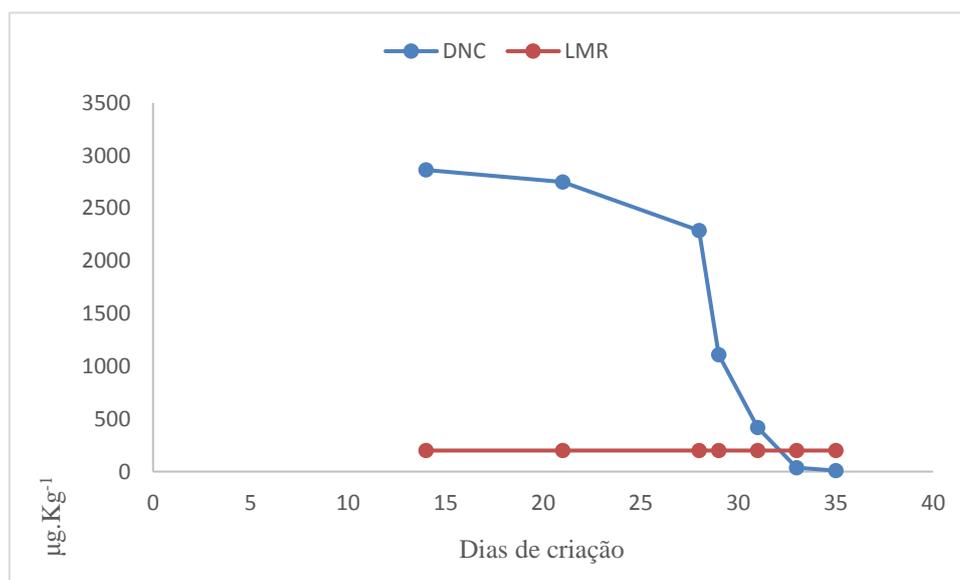


De acordo com os dados do presente trabalho, com os resultados encontrados por Olejnik et al. (2011) e as informações divulgadas por EFSA (2004) o período de retirada de cinco dias estabelecido pela legislação (Brasil, 2008) é suficiente para que não seja encontrado no músculo resíduos de narasina acima do LMR.

A rápida metabolização da narasina, justifica os resultados referentes a presença de resíduos dessa droga em produtos de origem animal, como os divulgados pela União Europeia, durante 2004 e 2005, em que 12.084 amostras foram analisadas e nenhuma amostra foi positiva para narasina (EFSA, 2007). Assim como Kim et al. (2012), que não encontraram nenhuma amostra com resíduos de narasina em 65 amostras de carne de frango analisadas. Além do histórico do PNCRC no qual durante o período de 2008 a 2014, foram analisadas 1.321 amostras com nenhuma positiva para narasina (Brasil, 2009; Brasil, 2010; Brasil, 2011; Brasil, 2012; Brasil, 2013; Brasil, 2014b; Brasil, 2015).

Apesar de Olejnik et al (2011) terem trabalhado com galinhas de postura e o presente trabalho com frango de corte, ambos trabalhos utilizaram a associação de narasina e nicarbazina. Nas aves de postura a nicarbazina a partir do segundo dia do período de retirada já estava abaixo do LMR, enquanto que no presente trabalho com frangos de corte, foram necessários quatro dias.

Figura 10 Concentrações médias de resíduos de DNC x LMR analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, dos animais tratados com nicarbazina + narasina,

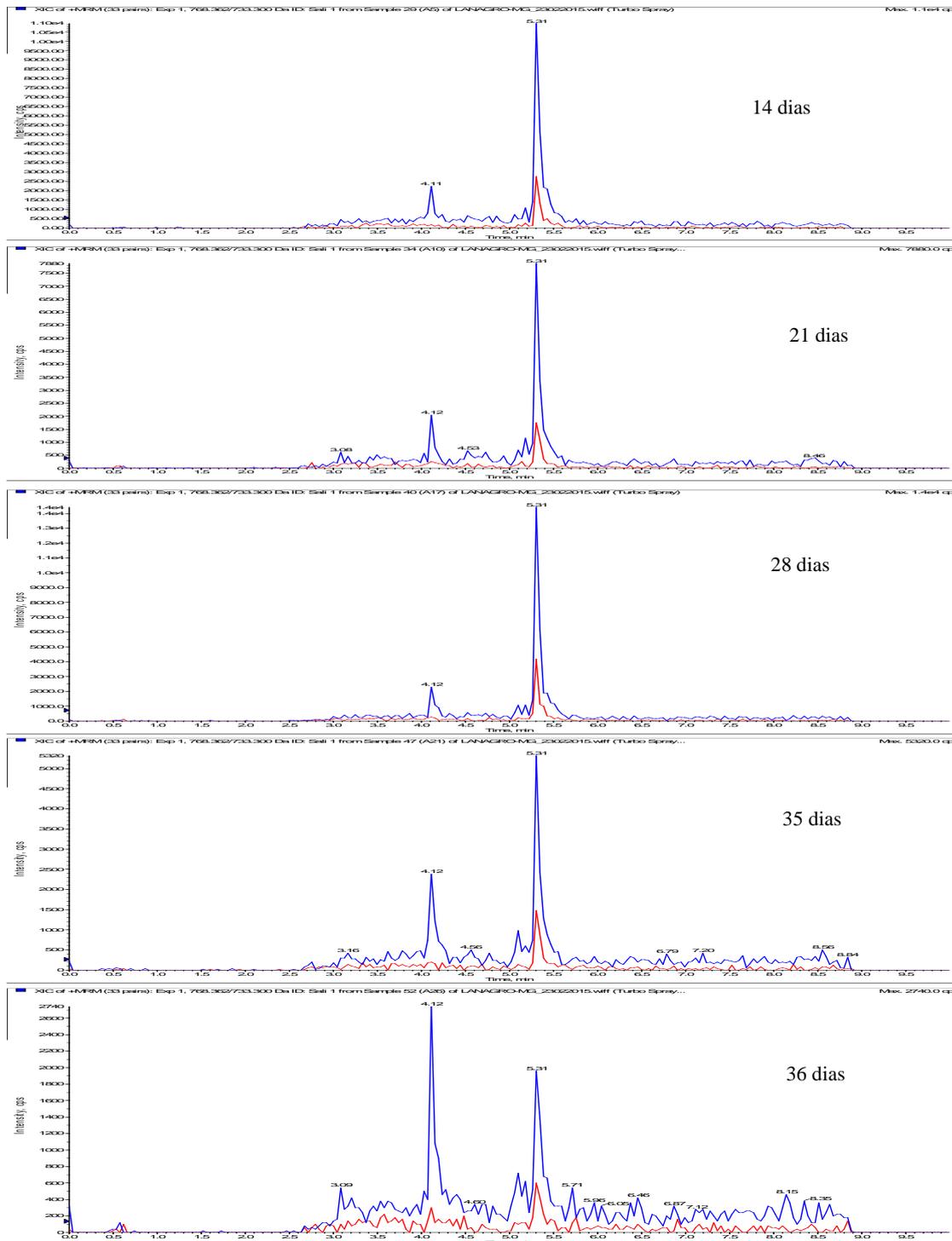


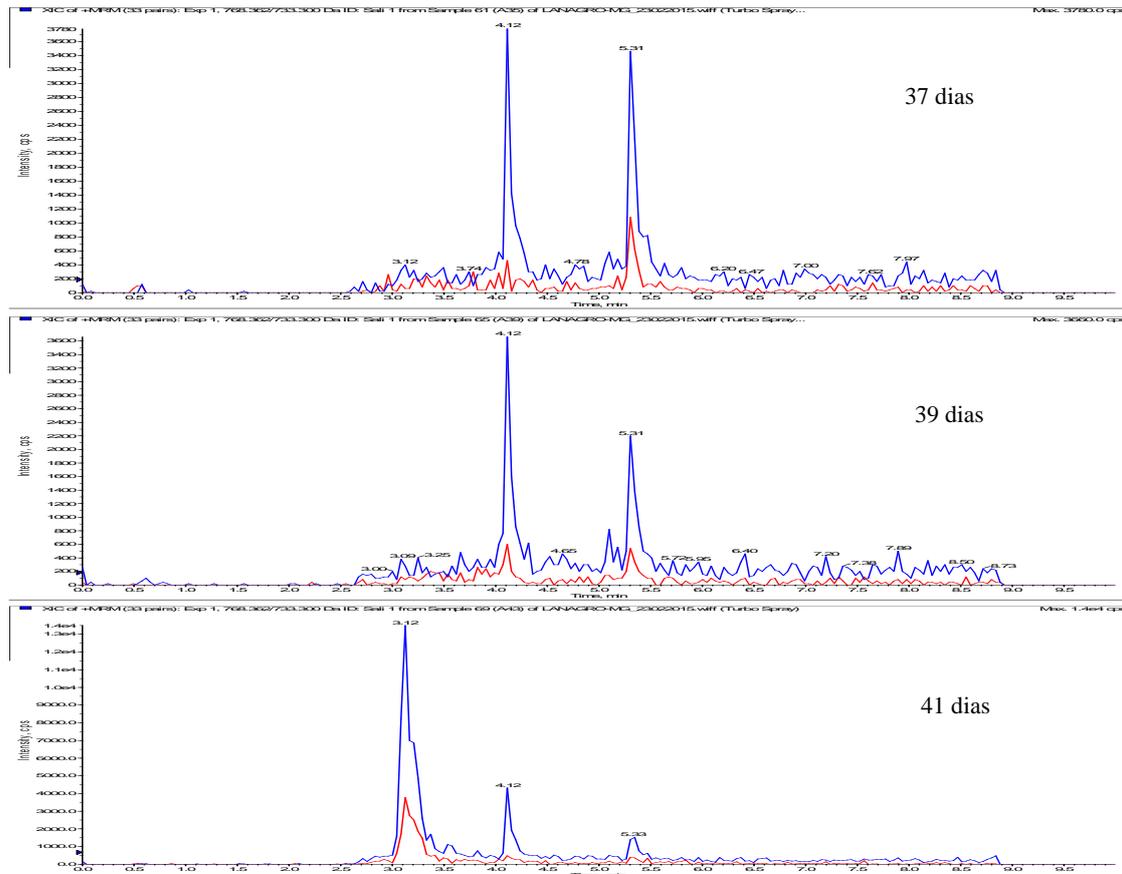
durante o período de tratamento e de avaliação residual

5.2.4 Salinomicina

Picos cromatográficos no tempo de retenção da salinomicina foram observados, porém não foi possível sua detecção pelo método utilizado (LOD: 6,25 µg.Kg⁻¹) (Fig. 11).

Figura 11 Cromatogramas referentes as amostras de músculo da coxa e do peito coletadas nos dias 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 e 41 dos frangos de corte tratados com salinomicina na ração





O período de retirada de uma droga visa garantir que os alimentos oriundos de animais tratados com esse produto não apresentem resíduos da droga em concentrações superiores ao LMR preconizado. De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2008), o LMR para salinomicina é de $150 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, portanto baseado nos dados encontrados no presente trabalho e no trabalho desenvolvido por Kennedy et al. (1995), não foi observada a necessidade de realização de período de retirada para salinomicina quando se pesquisa a presença de resíduos dessa droga na musculatura de frangos de corte. Isso pode ser comprovado pelos resultados publicados pelo PNCRC, durante o período de 2008 a 2014, em que 1.355 amostras de músculo de frango foram analisadas e nenhuma apresentou resíduos de salinomicina (Brasil, 2009; Brasil, 2010; Brasil, 2011; Brasil, 2012; Brasil, 2013; Brasil, 2014b).

Porém deve-se atentar para a possibilidade de ocorrência de resíduos da droga em outros tecidos, como os observados no Reino Unido entre 1995 e 2004, em que 7.409 produtos de origem animal foram analisados e resíduos de salinomicina foram encontrados em sete (0,09%) produtos. Dois (0,09%) ovos de galinha de um total de 2.133 continham salinomicina, nas concentrações de 15 e $20 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, uma (0,05%) amostra de fígado de frango de corte de um total de 1.837 apresentou o resíduo na concentração de $30 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$; uma (0,06%) amostra de fígado ovino de um total de 1.765 continha salinomicina na concentração de $4 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e em três (2,34%) amostras de fígado suíno de um total de 128, o medicamento foi detectado em concentrações de 11, 15 e $20 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. E na União Europeia, em que 30 (0,20%) amostras foram consideradas não conformes ($>10 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) dentre as 15.151 amostras analisadas, sendo 19 (0,54%) ovos de um total de 3.502, sete (0,10%) fígados de suíno, três (0,04%) amostras de fígado de frango e uma (0,01%) de fígado de

coelho de um total de 6.902 amostras analisadas (EFSA, 2008c).

De acordo com Atef et al. (1993), 8 horas de período de retirada foram suficientes para que as concentrações de salinomicina na musculatura aproximassem do LMR. Como na prática os animais devem passar por um período mínimo de jejum de 6 horas antes de serem abatidos, esse tempo contribui para uma maior segurança com relação a possibilidade de ocorrência de resíduos de salinomicina na musculatura, caso ocorra fornecimento acidental de ração contendo salinomicina próximo ao abate.

5.2.5 Monensina

Os resultados encontrados para a pesquisa de monensina em músculo da coxa e do peito dos frangos de corte encontram-se na Tab. 7. O LMR estabelecido pelo PNCRC é de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Tabela 7 Resultados das concentrações médias de resíduos de monensina analisados pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, durante os períodos de tratamento com monensina e durante a avaliação residual

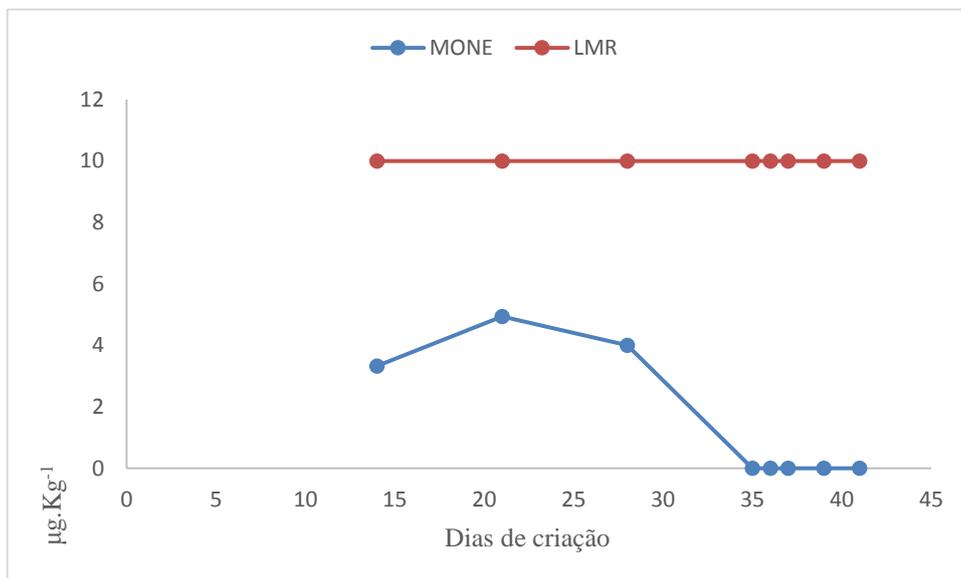
| Dias de análise | Médias das concentrações ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) |
|-----------------|--|
| 14 | 3,58 a |
| 21 | 4,86 a |
| 28 | 3,83 a |
| 35 | ND b |
| 36 | ND b |
| 37 | ND b |
| 39 | ND b |
| 41 | ND b |

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

ND: não detectado ($< 1,25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$).

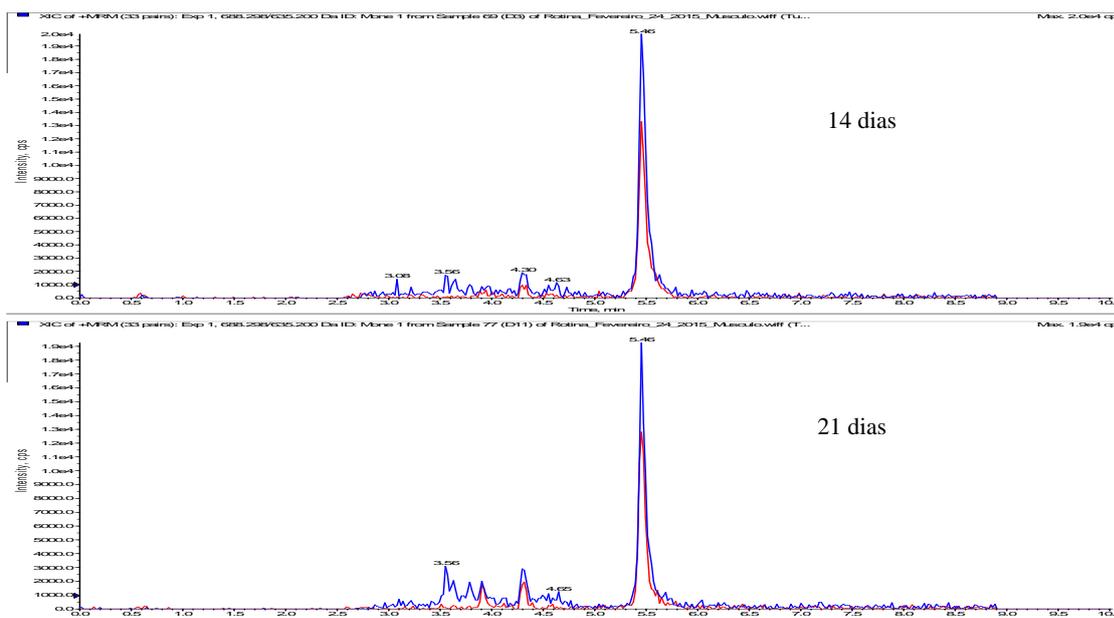
Na avaliação dos animais tratados com monensina a presença de resíduos ($P < 0,05$) foi detectada somente durante as três primeiras coletas (14^o, 21^o e 28^o dias de criação) e em concentrações inferiores ao LMR estabelecido, de 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. A partir da última coleta referente ao período em que a ração estava sendo fornecido com a droga e durante todo o período de retirada da droga, resíduos de monensina não foram mais detectados ($\text{LoD}: 1,25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$). A ausência de monensina na coleta do 35^o dia pode ser justificada pelo período de jejum de seis horas realizado nos animais antes do abate. Os níveis residuais nas primeiras coletas já estavam baixos e conforme demonstrado no trabalho de Chéneau et al. (2007) 8 a 10 horas são suficientes para a metabolização total da monensina no músculo.

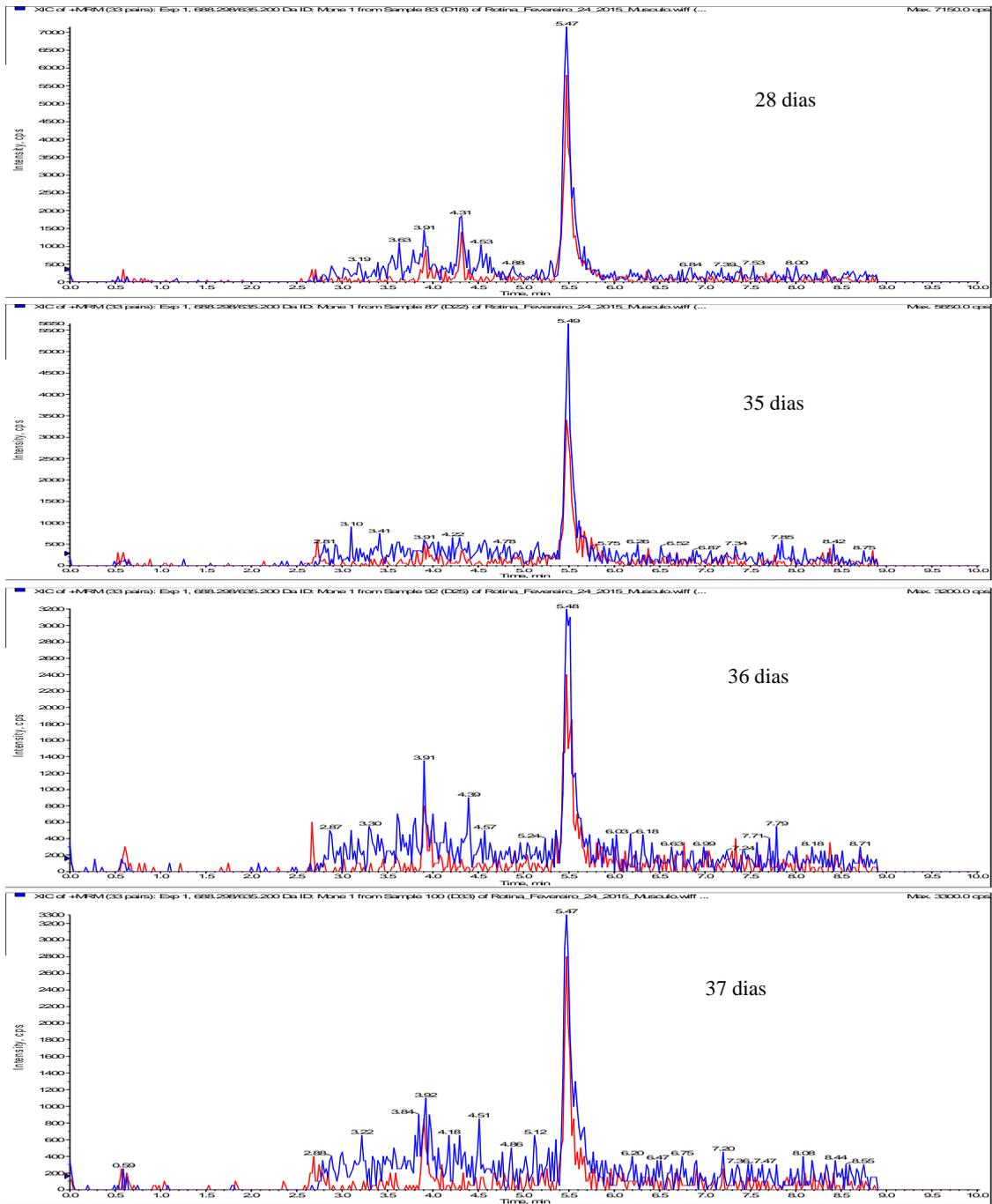
Figura 12 Concentrações médias de resíduos de monensina x LMR analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, dos animais tratados com monensina, durante o período de tratamento e de avaliação residual

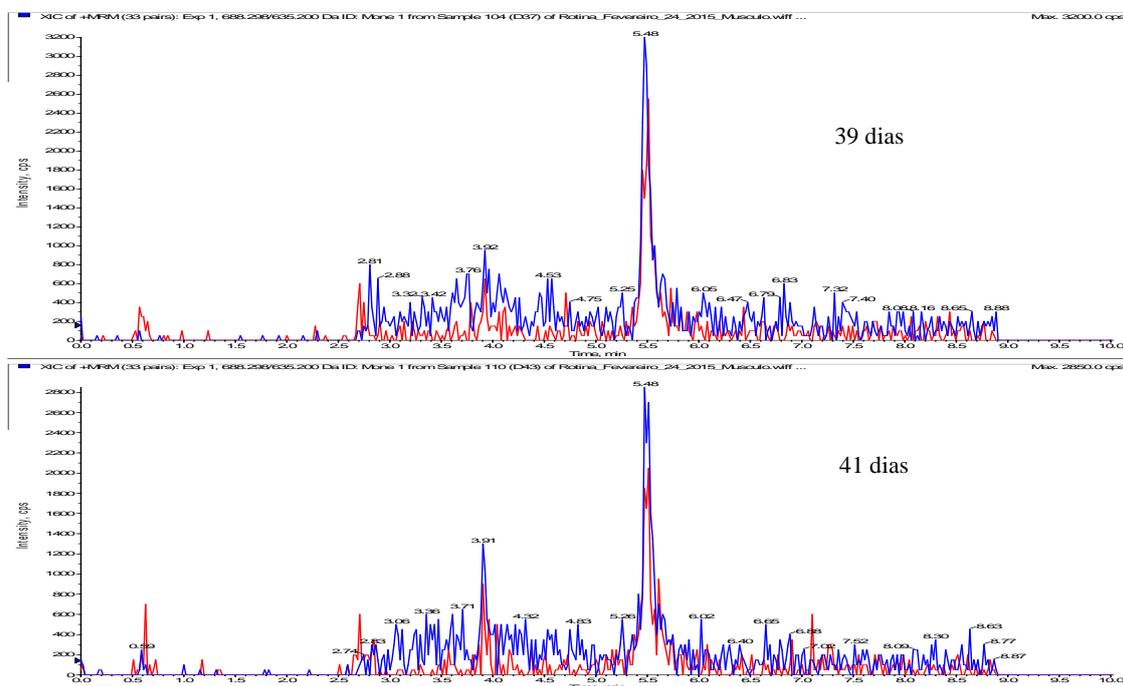


A Fig. 13 ilustra os cromatogramas gerados pelas análises das amostras de músculo da coxa e do peito, dos animais tratados com monensina. Foram observados picos cromatográficos contendo as duas transições no tempo de retenção esperado para monensina em todas as coletas, porém pela análise das duas transições a presença do resíduo só foi confirmada e quantificada nas três primeiras coletas.

Figura 13 Cromatogramas referentes as amostras coletadas nos dias 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 e 41 dos animais tratados com monensina na ração







Os resultados do presente trabalho, de Okada et al. (1980), da EFSA (2006) e de Chéneua et al. (2015) demonstram que a monensina é uma droga pouco absorvida e rapidamente metabolizada. Condições que garantem uma maior segurança com relação a possibilidade de ocorrência de resíduos no músculo dos animais tratados. Esse comportamento da droga, justifica os resultados observados no PNCRC, durante o período de 2008 a 2014, em que 1.258 amostras de músculo de frango de corte foram analisadas para pesquisa de monensina e nenhuma delas apresentou resíduos (Brasil, 2009; Brasil, 2010; Brasil, 2011; Brasil, 2012; Brasil, 2013; Brasil, 2014b).

Porém a presença de resíduos de monensina tem sido relatada no fígado, como os dados divulgados no Reino Unido entre 1995 e 2004, em que foram observados em 17 (0,78%) amostras de fígado de frango de corte, de um total de 2.205 amostras analisadas, com concentrações acima de 25 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$; em três (0,1%) amostras de fígado de ovino dentre 3.077 analisadas, em concentrações acima de 56 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ e em duas (0,68%) amostras de fígado bovino de um total de 292, com concentrações acima de 11 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Assim como na Bélgica, entre 2005 e 2006, 958 amostra de alimentos foram analisadas e resíduos de monensina detectados em cinco (0,52%) amostras de frango (sendo uma amostra de músculo), uma (0,10%) amostra de ovo, uma (0,10%) de músculo de cordeiro, uma (0,10%) de músculo de pato em concentrações maiores do que o LoD (2 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$), porém abaixo do nível considerado não conforme (>10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$) (EFSA, 2008d).

5.2.6 Semduramicina

Os resultados encontrados para a pesquisa de resíduos de semduramicina em músculo da coxa e do peito de frangos de corte encontram-se na Tab. 8. O LMR estabelecido pelo PNCRC é de 50 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Tabela 8. Resultados das concentrações médias de resíduos de semduramicina analisadas pelo método HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, tratados com semduramicina, durante o período de tratamento e de avaliação residual

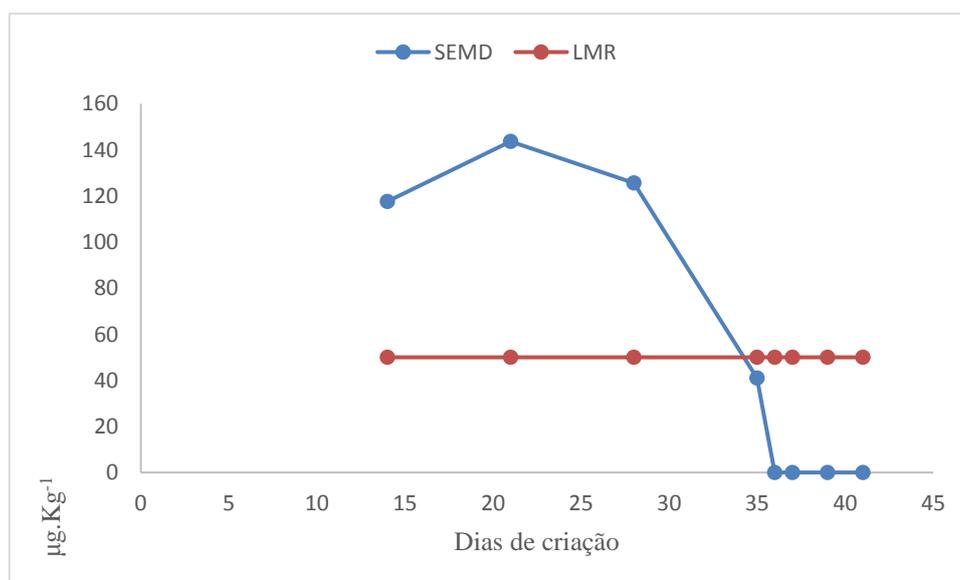
| Dias de análise | Médias das concentrações ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) |
|-----------------|--|
| 14 | 117,67 a |
| 21 | 143,67 a |
| 28 | 125,63 a |
| 35 | 40,95 a |
| 36 | ND b |
| 37 | ND b |
| 39 | ND b |
| 41 | ND b |

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

ND: não detectado ($< 6,25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$)

Na avaliação dos animais tratados com semduramicina foi observado que as maiores concentrações de resíduos do medicamento foram encontradas durante as três primeiras coletas (14º, 21º e 28º dias de criação- tabela 7) sem diferença estatística entre as concentrações observadas ($117 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $143 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $125 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) ($P < 0,05$). Na última coleta durante o fornecimento da droga (35 dias de criação) o nível residual de semduramicina atingiu valores abaixo do LMR, isso pode ser justificado pelo período de jejum de seis horas realizado antes do abate dos animais. Após a interrupção do fornecimento da ração, não foi mais detectado ($\text{LoD}: 6,25 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) resíduos de semduramicina (Fig. 14).

Figura 14 Concentrações médias de resíduos de semduramicina x LMR analisados pelo método de HPLC-MS/MS na matriz músculo de frango de corte, dos animais tratados com semduramicina, durante o período de tratamento e de avaliação residual



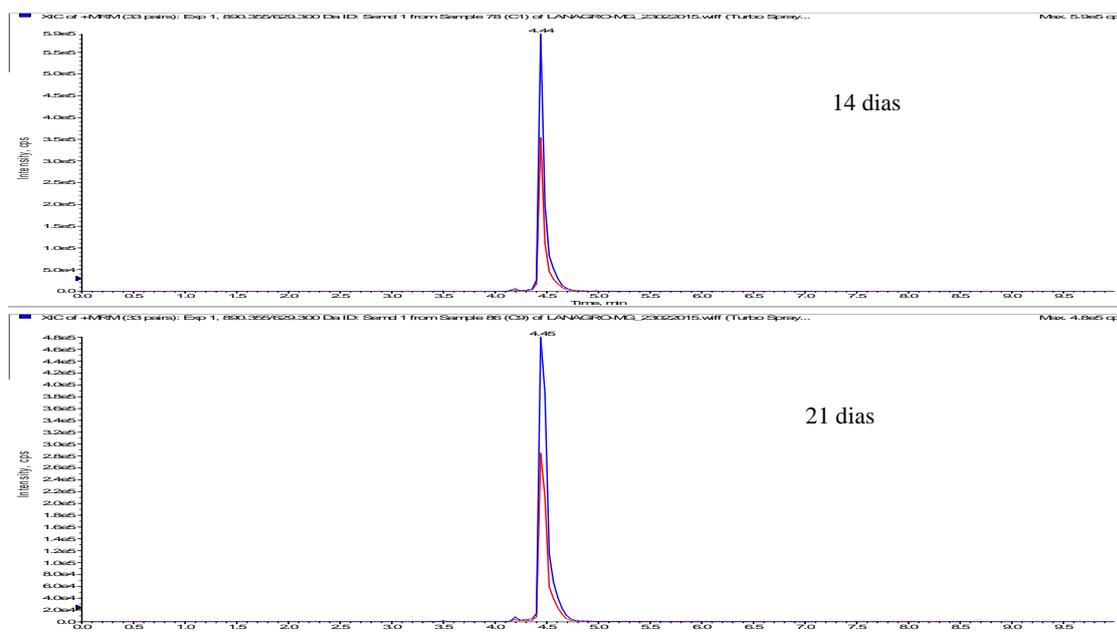
Em um estudo divulgado pelo Comitê Europeu, frangos de corte receberam ração contendo 25ppm de semduramicina durante sete dias e foram abatidos com seis, 12, 24, 48 e 120 horas após

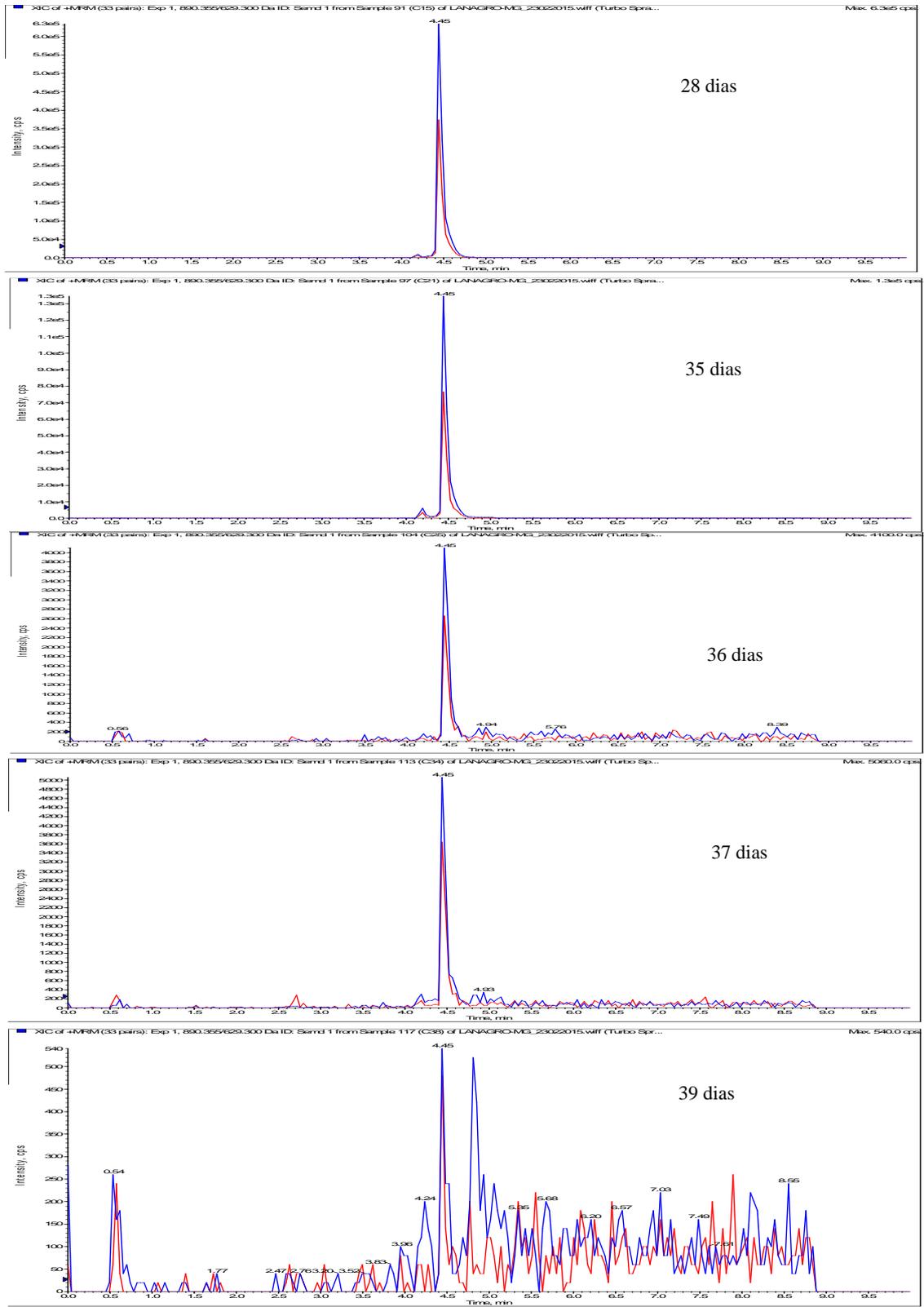
a retirada da droga. Amostras de fígado, músculo, rins, pele e pele com gordura foram analisadas e a semduramicina foi detectada em todos os tecidos e durante todo o período analisado. No músculo os valores observados foram de $15 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $7 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $3 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $2 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $1 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ após seis, 12, 24, 48 e 120 horas, respectivamente (EC, 2002). Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, os autores detectaram resíduos no músculo mesmo após a interrupção do tratamento. Porém, as concentrações encontradas foram abaixo do LMR.

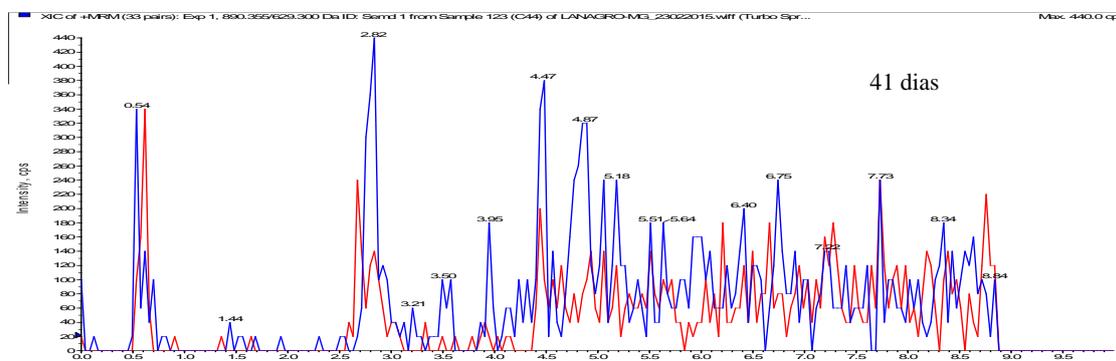
Apesar do LMR da semduramicina ter sido estabelecida pelo PNCRC apenas na matriz músculo, a pesquisa de resíduos em outras matrizes também é importante para a avaliação das características de metabolização da droga. Lynch et al. (1992) avaliaram amostras de fígado de frangos de corte que receberam ração com 25ppm de semduramicina durante 44 dias, e verificaram que com seis horas de período de retirada, o nível residual no fígado foi de $166 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e com 24 horas foi de $17 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Em outro estudo, frangos de corte machos e fêmeas receberam ração contendo 25 ppm de semduramicina durante 42 dias e as concentrações de resíduos de medicamentos foram de $77,8 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $48 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $40,9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (nas amostras das fêmeas) e de $155 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, $45,9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $38,3 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (nas amostras dos machos), após seis, 12 e 18 horas da retirada da ração medicada, respectivamente. Os valores encontrados por esses autores no fígado, foram superiores aos observados no músculo pelo Comitê Europeu (EC, 2002), sugerindo que o fígado desempenha um papel importante na metabolização da droga.

A Fig. 15 ilustra os cromatogramas gerados pelas análises das amostras de músculo da coxa e do peito dos animais tratados com semduramicina. Foram observados picos cromatográficos contendo as duas transições no tempo de retenção detectado para semduramicina em todas as coletas, porém a presença dos resíduos só foi confirmada e quantificada nas quatro primeiras coletas. Após esse período as concentrações estavam abaixo do LoQ.

Figura 15 Cromatogramas referentes as amostras de músculo de coxa e de peito coletadas nos dias 14, 21, 28, 35, 36, 37, 39 e 41 dos animais tratados com semduramicina na ração







A rápida metabolização da semduramicina justifica os resultados das pesquisas de resíduos da droga em produtos de origem animal, como os encontrados na Europa, em que 300 amostras (100 ovos, 100 fígado de frango de corte e 100 fígado de ovino), no ano de 2005 foram analisadas, e nenhuma apresentou valores considerados não conformes ($10 \mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$). O LoD do método foi $<1 \mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ (EFSA, 2008e). Assim como nos resultados do PNCRC realizado nos anos de 2013 e 2014, em que nenhuma amostra apresentou resultados positivo para semduramicina dentre 539 analisadas (Brasil, 2014b; Brasil, 2015).

O estudo e a definição do correto período de retirada dos anticoccidianos utilizados para tratamento dos frangos de corte tem impacto econômico e também na adequação do manejo. 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 obedecem o período necessário para a eliminação do medicamento e de seus resíduos do organismo do animal.

6 CONCLUSÃO

A avaliação da presença de resíduos de nicarbazina, nicarbazina + narasina, salinomicina, semduramicina e monensina durante o período de fornecimento da droga e por até seis dias após a interrupção do tratamento preventivo permitiu concluir que:

- A nicarbazina, a narasina, a semduramicina, a monensina são capazes de gerar resíduos na musculatura de frangos de corte.
- A concentração de resíduos de nicarbazina excede o LMR no músculo de frangos de corte. Sendo necessário um período de 4 a 6 dias de retirada da droga para que resíduos de DNC na musculatura fiquem abaixo do LMR exigido.
- Narasina e monensina, apesar de deixarem resíduos na musculatura de frangos de corte, não ultrapassam o LMR no músculo de frangos de corte, nem mesmo durante o período de fornecimento da ração contendo a droga.
- Semduramicina deixa resíduos na musculatura de frangos de corte e só excede o LMR durante o fornecimento da ração.
- A salinomicina não necessita de período de retirada com relação a presença de resíduos na musculatura de frangos de corte.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R. C. Liderança e Qualidade - Uso de agentes anticoccidianos para frangos de corte. Boletim Informativo Vaccinar, Ano 2 No 25. Vaccinar Nutrição Animal, 2004
- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. *União Brasileira de Avicultura*. Relatório Anual, 2015. (2016)
- APPLIED BIOSYSTEMS. Análise de resíduos de pesticidas em amostras ambientais e alimentos utilizando a técnica de LC/MS/MS. [São Paulo], 2004.
- ATEF, M., RAMADAN, A., YOUSSEF, S.A.H., et al. 1993. Kinetic disposition, systemic bioavailability and tissue distribution of salinomycin in chickens. *Research in Veterinary Science*, 54: 179-183.
- BARRETO, F. Identificação de perfis farmacocinéticos de resíduos de fármacos antimicrobianos utilizados na produção de frangos de corte. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientadora: Tereza Cristina Tavares Dalla Costa. Porto Alegre, 2014.
- BAYER. O que é a coccidiose. 2010. Disponível em: <<http://www.baycox.com.br/coccidiose.asp>> Acesso em: 24/08/2014.
- 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*, 520, 19-32, 2004.
- BEERS, K.W., RAUP, T.J., BOTTJE, W.G. et al. 1989. Physiological responses of heat stress broilers fed nicarbazin. *Poultry Science*, 68:428-434.
- BELLAVER, C. Utilização de Melhoradores de Desempenho na Produção de Suínos e de Aves. Campo Grande, MS. In: Congresso Internacional de Zootecnia. Campo Grande: ABZ/ UEMS/ UFMS, Embrapa, p.1 -29 2005.
- BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 85
- BRABANDER, H. F., NOPPE, H., VERHEYDEN, K., BUSSCHE, J. V., WILE, K., OKERMAN, L., VANHAECKE, L., REYBROECK, W., OOGHE, S., CROUBELS, S. Residues analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7964-7976, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da União*, de 22 de dezembro de 1999, Seção 1, p. 213. 1999

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº51 de 06 de maio de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal- PNCRB. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 de fevereiro 1986, Seção 1, p.2228.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 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. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 agosto de 1995, Seção 2, p. 6048.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo- PAMVet. Gerência Geral de Alimentos- GGALI, Gerência de Ações de Ciência e Tecnologia de Alimentos- GACTA. Brasília, novembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. Divisão de Aditivos/ CPAA/DFIP/DAS. 03 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº15 de 25 de maio de 2009. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 06 de 16 de março de 2010. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 06 de 25 de fevereiro de 2011. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 07 de 04 de abril de 2012. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 07 de 27 de março de 2013. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA nº 60 de 07 de maio de 2014. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 11 de 07 de maio de 2014. Aprova o escopo analítico do PNCRC/ Animal para o ano de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 22 de 07 de abril de 2015. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/ Animal referente ao exercício do ano de 2014.

CANNAVAN, A., KENNEDY, D.G. Possibles causes of nicarbazin residues in chicken tissues. *Food Additives and Contaminants*, 2000, v.17, n.12, 1001-1006.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. 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, No. 3, 623-636, 2008.

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

CLARKE, L., FODEY, T.L., CROOKS, S.R.H. et al. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *Meat Science*, v. 97, p. 358-374. 2014.

CODEX ALIMENTARIUS. Versão Portuguesa. CAC/RCP 1-1969 Ver.4-2003. Disponível em http://www.apicarnes.pt/pdf/segalcodex_.pdf. Acesso em 27/07/2015.

CODEX ALIMENTARIUS. Maximum Residue Limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2015. Updated as at the 38th session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015).

COSTA, C.A.F. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da coccidiose aviária. *Avicultura Industrial*, p12-16, 2001.

CUCKLER, A.C., MALANGA, C.M., BASSO, A.J. et al. Antiparasitic activity of substituted carbanilide complexes. *Science* 122:244-245. 1955.

DANAHER, M., CAMPBELL, K., O'KEEFFE, M. et al. Survey of the anticoccidial feed additive nicarbazin (as dinitrocarbanilide residues) in poultry and eggs. *Food Additives and Contaminants* v. 25(1), p.32–40, janeiro, 2008.

DINIZ, M.E.R. Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas. Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

DOYLE, M. E. Veterinary Drug Residues in Processed Meats – Potential Health Risk (A Review of the Scientific Literature). *FRI Briefings*, 2006.

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

DUBUGRAS, M. T. B.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, E. Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos: curso de sensibilização. (Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS). Rio de Janeiro, 2008. 160 p.

DUTRA, M.J. Influência dos anticoccidianos ionóforos sobre o grau de umidade no músculo peitoral de frangos de corte. 2002. 59p. Dissertação Ciência Veterinária. Universidade Federal do Paraná.

EC (European Commission). Report of Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of semduramicin sodium in feedingstuffs for chickens for fattening. Adopted on 17 April 2002. Disponível em http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out80_en.pdf acessado em 02/08/2015.

EC (European Commission) Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, Brussels, 2002, L 221, P.0008-00036.

EC (European Commission). Regulamento (CE) n°1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2003. Relativo aos aditivos destinados a alimentação animal. Jornal Oficial da União Europeia, 18 de outubro de 2003.

EC (COMMISSION DIRECTIVE) 2009/8/EC of february 2009 amending Annex 1 to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonstats in non-target feed. *Official Journal of the European Union L*, 40, 19-25.

EEC, Council Regulation No 2377/90 of 26 June 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities L* 224, 18/08/1990, pp. 0001 - 0008, 1990.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Additives and products or Substances Used in Animal Feed on the request from the Commission on the efficacy and safety of the coccidiostat “Koffogran”. *The EFSA Journal*, 16:1-40. 2003.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Additives and products or Substances Used in Animal Feed on the request from the Commission on the efficacy and safety of the coccidiostat Monteban G100 in accordance with Article 9G of Council Directive 70/524/EEC. *The EFSA Journal*, 90:1-44. 2004.

EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Additives and products or Substances Used in Animal Feed on the safety of Coxidin® (monensin sodium). *The EFSA Journal*, 381:1-10. 2006.

EFSA (European Food Safety Authority) Cross-contamination of non-target feedingstuffs by narasin authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 552: 1-35, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority) Cross-contamination of non-target feedingstuffs by decoquinato authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 690: 1-34, 2008a.

EFSA (European Food Safety Authority) Cross-contamination of non-target feedingstuffs by nicarbazin authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 690: 1-34, 2008b.

EFSA (European Food Safety Authority) Cross-contamination of non-target feedingstuffs by salinomycin authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 591: 1-38, 2008c.

EFSA (European Food Safety Authority) Cross-contamination of non-target feedingstuffs by monensin authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 592: 1-40, 2008d.

EFSA (European Food Safety Authority) Cross-contamination of non-target feedingstuffs by semduramicin authorized for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 593: 1-27, 2008e.

EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Opinion on the safety and efficacy of Koffogran (nicarbazin) as a feed additive for chickens for fattening. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *The EFSA Journal*, 8(3):1551, 2010.

EVANS, R. Modo de Ação de Maxiban e o Impacto sobre o Controle da Coccidiose. Revisão de Pesquisas- Frango de Corte. Elanco Animal Health. 27 de julho de 2010.

FERREIRA, A. J. P. e PIZARRO, L.D.C.R. Cap.46-Agentes antiprotozoários. In: Spinosa, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Quinta Edição. Editora: Guanabara Koogan. 2011.

PHIBRO ANIMAL HEALTH. Aviax II Semduramicin. Type A medicated Article. Broiler Chickens. "For prevention of coccidiosis caused by *Eimeria tenella*, *E.acervulina*, *E.brunetti*, *E.necatrix* and *E.mitis*". NADA 121-281. Freedom of information summary. Original New Animal Drug Application. 07/12/2007.

FORTES, E. Parasitologia veterinária. 4. ed. São Paulo: Ícone, 2004. p. 105-112.

FIORENTIN, L. Implicações da reutilização da cama de aviário para a saúde pública e animal. EMBRAPA suínos e Aves. Anais do IV Seminário Internacional de Aves e Suínos 2005. Anais. Florianópolis: IV Seminário Internacional de Aves e Suínos, 2005.

GLOBAL MRL DATABASE. A service of Bryant Christie Inc. Disponível em: www.globalmrl.com. Acesso em 10 de agosto de 2015.

GONZALES, E; Apostila – Aditivos Para Rações de Aves e Suínos. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ-UNESP Campus de Botucatu. Botucatu – SP, 2001.

GREBER, S.F.G., SINGH, R.J. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory- Where to from here? *Clin. Biochem Rev* v.32, p.05-31, 2011.

GUERRERA, I., KLEINER, O. A. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience reports*, v. 25, Nº 1/2, 2005.

KANT, V., SINGH, P., VERMA, P.K. et al. Anticoccidial Drugs in the Poultry: An Overview. *Science International* (7): 261-265, 2013.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: Berchieri, Jr., A.; Macari, M. Doenças das Aves.

Campinas: FACTA, 2000. p. 391- 405.

KENNEDY, D.G., BLANCHFLOWER, W.J. and O'DORNAN, B.C. Development of an ELISA for salinomycin and depletion kinetics of salinomycin residues in poultry. *Food Additives Contaminants* 12:93-99, 1995

KIM, E., BAHN, K., KANG, E. et al. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 132: 1063-1070, 2012.

KINSELLA, B., O'MAHONY, MALONE, E., MALONEY, M., CANTWELL, H., FUREY, A., DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*. 1216, 7977-8015, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. *Scientia Chromatographica*, v.5, p.27-46, 2009.

LEVINE, N. D. The protozoan phylum Apicomplexa. Boca Raton, FL, USA,

CRC Press, 1988. Vol. 1.

LIANG, C., CHENG, L., SHEN, J., ZHANG, Y., ZHANG, S. Determination of 5 polyether antibiotics in chicken tissues by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, v.27, p.815–819, 2009.

LIMA, J. D.; Coccidiose Dos Ruminantes Domésticos. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Reviews*, v. 1, n. 1, p. 47-65, 2000.

LYNCH, M.J., FRAME, G.M., ERICSSON, J.F. et al. Semduramicin in the chicken, tissue residue depletion studies. *ACS Symposium Series* 503: 49-69, 1992.

MALDANER, L; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*. V.31, p.214-222. 2009.

MARTINS, G.P., BOGADO, A.L.G., JUNIOR, J.S.G. et al. O uso de vacinas no controle da coccidiose aviária. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.33, n.3, p.1165-1176, mai/jun.2012.

MCEVOY, J.D.G., SMYTH, W.G., KENNEDY, D.G. 2003. Contamination of animal feedingstuffs with nicarbazin: Investigations in a feed mill. *Food Additives and Contaminants* 20:136-140.

MOLONEY, M., CLARKE, L., O'MAHONY, J., et al. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. V.1253, p. 94-104, 2012.

MYLLYNIEMI, A. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat. 2004. 87f. *Faculty of Veterinary Medicine*, University of Helsinki.

MITCHEL, J. M.; GRIFFITHS, M. W.; MCEWEN, S. A.; MCNAB, W. B.; YEE, A. J. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 6, p.742-756, 1998

NERY, L.R. *Uso de anticoccidiano, de glicina e de glutamina/ácido glutâmico em dietas com diferentes relações treonina /lisina para frangos de corte criados sob desafio sanitário*. Tese em Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG:2009.

OKADA, J., HIGUCHI, I. AND KONDO, S.. Determination of the disappearance rate and residual levels of monensin in chick tissues by quantitative thin-layer bioautography. *J. Food Hyg. Soc.* 21, 177-183, 1980.

OLEJNIK, M., SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T., JEDZINIAK , P. Depletion study on nicarbazin and narasin in tissues and eggs of hens housed in deep litter. *Bull Vet Inst Pulawy* V. 55, P.761-766, 2011.

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

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n.8, p.2190-2193, 2008.

PIETRUK, K., OLEJNIK, M., JEDZINIAK, P. et al. Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 112, p.50-59, 2015.

PIRÁGINE, M. R. [2010] Coccidiose Aviária. Abase Comércio e Representações Ltda. Disponível em:
<http://www.naturezaforte.com.br/aves/aulas_teoricas/coccidiose.pdf> Acesso em: 19/08/2014.

REVIERE, J.E. Comparative Pharmacokinetics. Principles, Techniques e Applications. 2ª Edição. Iowa. Wiley-Blackwell. 2011.

ROGERS, E.F., BROWN, R.D., BROWN, J.E. et al. Nicarbazin complex yields dinitrocarbalinide as ultrafine crystals with improved anticoccidial activity. *Science* 222:630-632, 1983.

ROKKA, M., JESTOI, M., PELTONEN, K. Trace Level Determination of Polyether Ionophores in Feed. *BioMed Research International*, volume.2013, Artigo ID151363, 12 páginas, 2013.doi:10.1155/2013/151363.

SADIA - Nicarbazina seu uso em frangos de corte e resíduos da droga na carcaça. Concórdia: Núcleo de nutrição Animal Sadia. [s.n]. 1992. (Reunião técnica).

SCHALLEY, C.A. *International Journal Mass Spectrometry*, v.11, p.194, 2000.

SILVA, E.P. Validação de método de extração e análise multirresíduos de medicamento veterinário em amostra de leite e ovos por LC-MS/MS. Tese no Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade de Brasília. 2013.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia*, v.55, p.95-99, 2002.

SPISSO, B.F. Inocuidade de alimentos de origem animal: Determinação de resíduos de ionóforos poliéteres, macrolídeos e lincosamidas em ovos e de tetraciclina em leite por CLAE-EM/EM. 2010. 132p. Tese em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2010.

TOLDRA, F.; REIG, M.; *Trends Food Sci. Technol.* 2006, 17, 482.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J Chromatogr A*. v.921, p.227-36, 2001.

WENTS, G.N. Validação do método analítico para determinação de cloranfenicol em matriz de camarão segundo norma da Comunidade Europeia EC 657/2002, por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS). Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso- QUI” do Curso de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Porto Alegre. 2010.

WIERNUZ, C.J., TEETER, R.G. 1995. Nicarbazin effects on broiler thermobalance during high ambient temperature stress. *Poultry Science*, 74:577-580.

YODER, C.A., MILLER, C.A. AND BYNUM, K.S. 2005. Comparison of nicarbazin absorption in chickens, mallards, and Canada geese. *Poultry Science*. 84: 1491-1494.

ZHAO, X., DUSZYNSKI, D.W., LOKER, E.S. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. *Journal of Microbiological Methods*, v.44, n.2, p.131-137, 2001.