

Débora Cristina Sampaio de Assis

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR UPLC/MS-MS
PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS
EM MÚSCULO DE FRANGOS DE CORTE APÓS TRATAMENTO**

Tese 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 Caçado.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2015

A848v Assis, Débora Cristina Sampaio de, 1987-
Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento / Débora Cristina Sampaio de Assis. – 2015.
72 p.: il.

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

1. Frango de corte – Carcaças – Teses. 2. Carne de frango – Análise – Teses.
3. Resíduos de drogas em veterinária – Teses. 4. Antimicrobianos – Teses. I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

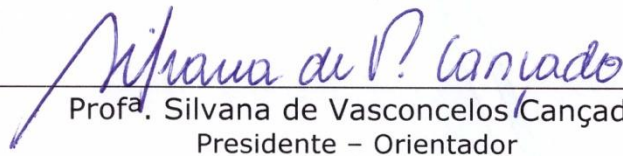
CDD – 664.07

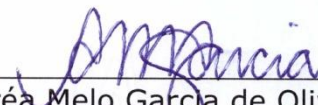
FOLHA DE APROVAÇÃO

DÉBORA CRISTINA SAMPAIO DE ASSIS

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 22 de Dezembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Profª. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente – Orientador


Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira
LANAGRO- MG


Prof. Thiago Moreira dos Santos
IFNMG- Salinas


Profª. Kelly Moura Keller
Escola de Veterinária - UFMG


Profª. Cléia Batista Dias Ornellas
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela formação profissional, que possibilitou essa caminhada.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG pelo apoio durante todas as etapas do curso.

À Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária da UFMG, por permitir o uso de suas instalações para a execução deste projeto.

Ao Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM), do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), especialmente à Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira e à Mary Ane Gonçalves Lana, pela parceria e por possibilitar a realização das análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus, pelas oportunidades e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais.

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo apoio e dedicação incondicional, pelos ensinamentos, pelo eterno incentivo e por ter orgulho das minhas conquistas.

À minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, pelo apoio e companheirismo.

À minha vó Jovita, por sempre valorizar a educação, pelo carinho, pelos conselhos, pela paciência e por me apoiar em todos os momentos.

À Profa. Silvana de Vasconcelos Cançado, que não foi apenas uma orientadora, mas uma “mãe” para mim. Agradeço não só pelo empenho e oportunidade para a realização deste projeto, mas também pela compreensão, pelos ensinamentos, pelo eterno incentivo, e principalmente, pelo grande carinho, amizade e confiança. Estou e estarei sempre ao seu lado!

Aos meus co-orientadores, Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo e Prof. Leonardo José Camargos Lara, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela enorme contribuição nesse trabalho.

Aos membros da comissão examinadora, Profa. Cléia Batista Dias Ornellas, Profa. Kelly Moura Keller, Prof. Thiago Moreira dos Santos e Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira pela disponibilidade e prontidão em aceitar participar da banca, pela cooperação e sugestões.

Ao Prof. Wagner, pela enorme dedicação à Medicina Veterinária, pela amizade, confiança, pelos conselhos e ensinamentos, que foram fundamentais para a minha formação profissional.

À Profa. Cléia Batista Dias Ornellas, pela amizade, pela compreensão, pelo incentivo e apoio durante a execução do experimento.

À Profa. Lílían Viana Teixeira pela grande disponibilidade, amizade, dedicação e incentivo.

Ao Prof. Marcelo Resende de Souza, pela grande contribuição em minha formação profissional, disponibilidade e dedicação ao ensino.

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

À Liliane Denize Miranda Menezes, minha eterna e grande amiga, que sempre esteve disponível para me ajudar! Agradeço pela grande contribuição para minha formação pessoal e profissional

Aos amigos que auxiliaram na execução deste experimento e tornaram esta caminhada mais leve: Guilherme Resende, Isabela Lanza, Marcela Triginelli, Viviana Fraga e Marina.

À Ana Cláudia pelo incentivo e apoio técnico irrestrito; aos demais amigos do LRM, Aline, Andréa, Cristiane Gláucia, Cristiana Paiva, Diego, Flávio, Josefa, Leila, Léo, Mary, Rose, Sergio Dracz e Olívia pelos agradáveis momentos.

A todos os funcionários da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, pelo apoio essencial na criação das aves, especialmente à Fabiana, Carlinhos, Douglas, Gilson, Sr. Luiz e D.Anita.

À todos os professores e funcionários do DTIPOA, em especial ao Miltinho pela disponibilidade.

Finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1. Enrofloxacina.....	18
3.1.1. Modo de ação.....	19
3.1.2. Apresentações comerciais.....	19
3.1.3. Relações com outros medicamentos.....	19
3.1.4. Indicações de uso.....	19
3.1.5. Período de retirada.....	19
3.1.6. Legislação mundial e brasileira.....	20
3.1.7. Toxicidade.....	20
3.2. Sulfaquinoxalina.....	20
3.2.1. Modo de ação.....	20
3.2.2. Apresentações comerciais.....	21
3.2.3. Relações com outros medicamentos.....	21
3.2.4. Indicações de uso.....	21
3.2.5. Período de retirada.....	21
3.2.6. Toxicidade.....	21
3.3. Oxitetraciclina.....	22
3.3.1. Modo de ação.....	22
3.3.2. Apresentações comerciais.....	22
3.3.3. Relações com outros medicamentos.....	22
3.3.4. Indicações de uso.....	22
3.3.5. Período de retirada.....	22
3.3.6. Toxicidade.....	22
3.4. Regulamentações sobre a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal.....	23
3.5. Métodos analíticos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos.....	26
3.5.1. Métodos físico-químicos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos.....	26
3.5.2. Cromatografia.....	26
3.5.3. Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).....	28
3.5.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS).....	29
3.5.5. Espectrometria de massas sequencial.....	36
3.6. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em carne de frango.....	38
3.7. Validação de métodos analíticos.....	39
3.7.1. Linearidade.....	40
3.7.2. Seletividade.....	40
3.7.3. Limite de detecção.....	41
3.7.4. Limite de quantificação.....	41
3.7.5. Precisão.....	42
3.7.6. Exatidão.....	42
3.7.7. Limite de decisão ($CC\alpha$).....	43
3.7.8. Capacidade de detecção ($CC\beta$).....	43

4.	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1.	Reagentes e padrões.....	44
4.2.	Preparo dos reagentes e padrões	44
4.3.	Validação do método analítico por UPLC/MS-MS para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte	44
4.3.1.	Preparo das amostras.....	44
4.3.2.	Parâmetros instrumentais.....	45
4.3.3.	Procedimentos de validação	46
4.4.	Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte.....	48
4.4.1.	Criação das aves.....	48
4.4.2.	Tratamentos	49
4.4.3.	Avaliação de resíduos de medicamentos veterinários	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1.	Validação do método analítico por UPLC/MS-MS para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte	49
5.1.1.	Linearidade	49
5.1.2.	Seletividade	50
5.1.3.	Precisão	53
5.1.4.	Exatidão	54
5.1.5.	Limites de detecção e quantificação	54
5.1.6.	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).....	55
5.2.	Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte	55
5.2.1.	Enrofloxacina	56
5.2.2.	Sulfaquinoxalina	59
5.2.3.	Oxitetraciclina.....	62
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Limites máximos de resíduos para agentes antimicrobianos segundo o Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia em tecidos de aves.....	22
Tabela 2 -	Antimicrobianos e seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR) de acordo com o <i>Codex Alimentarius</i>	23
Tabela 3 -	Antimicrobianos e seus limites de referência estabelecidos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para o ano de 2015.....	23
Tabela 4 -	Valores de recuperação e coeficientes de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos.....	41
Tabela 5 -	Gradientes das fases móveis em função do tempo de corrida.....	43
Tabela 6 -	Transições MRM e condições do espectrômetro de massas utilizadas para cada analito	44
Tabela 7 -	Coeficientes de variação obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliação da precisão do método.....	51
Tabela 8 -	Recuperações médias dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina na matriz músculo de frangos de corte.....	52
Tabela 9 -	Limites de detecção e de quantificação do método UPLC-MS/MS para os antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina na matriz músculo de frangos de corte	52
Tabela 10 -	Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método UPLC-MS/MS para os antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina na matriz músculo de frangos de corte.....	53
Tabela 11 -	Resultados das concentrações médias de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacina e ciprofloxacina analisados pelo método validado de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual	55
Tabela 12 -	Resultados das concentrações médias de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisados pelo método validado de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual	58
Tabela 13 -	Resultados das concentrações médias de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados pelo método validado de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição das rações e níveis nutricionais calculados	46
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência	25
Figura 2 -	Componentes básicos de um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	27
Figura 3 -	Esquema de um analisador quadrupolar	30
Figura 4 -	Esquema simplificado de um ToF com o <i>reflectron</i> fora de operação (a) e em operação (b), ilustrando a curva na trajetória dos íons provocada pelo refletor.....	31
Figura 5 -	Analisador do tipo ToF com sistema de aceleração ortogonal (oa) e <i>reflectron</i> , podendo operar no modo LC/MS-MS na configuração Q-ToF (quadrupolo -ToF) ou no modo LC-ToF utilizando o quadrupolo apenas como filtro de massa, ao invés de analisador, ou seja, aplicando apenas radiofrequência, Rf (Rf-only mode).....	32
Figura 6 -	Eletrodos que formam a parte principal de um analisador do tipo ion trap. O eletrodo central é utilizado para aprisionar os íons, enquanto os outros dois servem um para focalizar a entrada dos íons provenientes da fonte de ionização no eletrodo central e o outro para focalizar a saída dos íons em direção ao detector.....	33
Figura 7 -	Analisador do tipo orbitrap.....	34
Figura 8 -	Esquema de um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF).....	35
Figura 9 -	Curvas de linearidade dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, adicionados ao músculo de frango, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	48
Figura 10 -	Cromatograma da análise de matriz branca (músculo de frango de corte sem adição de solução padrão) para avaliação da seletividade.....	49
Figura 11 -	Solução padrão dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina adicionada à matriz músculo de frangos de corte.....	49
Figura 12 -	Transições dos antimicrobianos enrofloxacina (A), ciprofloxacina (B), sulfaquinoxalina (C) e oxitetraciclina (D) monitoradas matriz músculo de frangos de corte.....	50
Figura 13 -	Solução padrão dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina adicionada à água.....	50
Figura 14 -	Transições dos antimicrobianos enrofloxacina (A), ciprofloxacina (B), sulfaquinoxalina (C) e oxitetraciclina (D) monitoradas na análise do padrão direto.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 15 -	Cromatogramas da pesquisa de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacina (A), ciprofloxacina (B), sulfaquinoxalina (C) e oxitetraciclina (D) em amostra de músculo de frango de corte do grupo controle.....	54
Figura 16 -	Cromatograma da análise de amostra de músculo de frangos de corte tratados com enrofloxacina na água de beber, coletada no 33º dia de criação.....	55
Figura 17 -	Concentrações médias de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacina e ciprofloxacina analisados pelo método de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual.....	56
Figura 18 -	Concentrações médias de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisados pelo método de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual.....	58
Figura 19 -	Cromatograma da análise de amostra de músculo de frangos de corte tratados com sulfaquinoxalina na água de beber, coletada no 33º dia de criação.....	59
Figura 20 -	Concentrações médias de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados pelo método de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual.....	61
Figura 21 -	Cromatograma da análise de amostra de músculo de frangos de corte tratados com sulfaquinoxalina na água de beber, coletada no 33º dia de criação.....	61

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a presença e os níveis de resíduos de antimicrobianos no músculo de frangos de corte, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC/MS-MS), foram utilizados 320 frangos de corte da linhagem Cobb alojados em oito boxes experimentais contendo 40 aves cada. Os tratamentos, definidos de acordo com o antimicrobiano fornecido às aves via água de beber, foram os seguintes: A) aves não receberam medicamento (controle); B) aves que receberam enrofloxacina na água de beber; C) aves que receberam sulfaquinoxalina na água de beber e D) aves que receberam oxitetraciclina na água de beber. Os medicamentos foram fornecidos aos animais nos dias 32, 33 e 34 de criação. As aves dos grupos B, C e D foram abatidas nos dias 32, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44 e 46 dias de criação, enquanto as aves do grupo A, foram abatidas nos dias 35, 36, 38, 40, 42, 44 e 46 para coleta de amostras do músculo do peito e da coxa para avaliação de resíduos dos antimicrobianos utilizados. A metodologia analítica por UPLC/MS-MS foi validada e apresentou alta seletividade, linearidade (coeficiente de correlação superior a 0,99), exatidão adequada, com recuperações médias variando entre 86,40 e 107,08%, limites de detecção (LD) entre 1,76 e 6,71, limites de quantificação (LQ) variando de 5,33 a 20,34, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) variando de 111,34 a 120,86 e de 122,67 a 141,72, respectivamente. Os resultados das análises das amostras de músculo dos frangos de corte demonstraram a presença de resíduos dos antimicrobianos, em concentrações acima dos limites máximos de resíduos (LMR) de cada droga, até o 36º de criação das aves, isto é, dois dias após o término do tratamento dos animais. A partir do 38º dia de criação das aves, as concentrações de resíduos observadas foram inferiores ao limite de quantificação do método para os medicamentos avaliados. Foi concluído que o método de UPLC/MS-MS apresenta as características de desempenho necessárias, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina em músculo de frangos de corte. Além disso, todos os antimicrobianos utilizados são rapidamente metabolizados pelos frangos de corte, pois, quatro dias após a retirada dos medicamentos, as concentrações de resíduos encontradas foram inferiores ao limite de quantificação do método para todos os analitos estudados.

Palavras-chave: carne de frango, resíduos, antimicrobianos, UPLC/MS-MS

ABSTRACT

In order to evaluate the presence and the levels of antimicrobial residues in the broiler chickens muscle, by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MS-MS), were used 320 broiler chickens from Cobb line, that were housed in 8 units (pens) containing 40 birds each. The treatments, were defined according to the antimicrobial provided to broilers via drinking water, and they were as follows: A) birds received no drug (control); B) birds that received enrofloxacin in the drinking water; C) birds that received sulphaquinoxaline via drinking water and D) birds that received oxytetracycline in drinking water. The drugs were provided to the animals on days 32, 33 and 34 of rearing. The birds of groups B, C and D were slaughtered on days 32, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44 and 46 days of rearing, while birds in group A were slaughtered on days 35, 36, 38, 40, 42, 44 and 46 to collect thigh and breast muscle samples for evaluation of antimicrobial residues used. The analytical method by UPLC/MS-MS was validated and showed high selectivity, linearity (correlation coefficient greater than 0.99), adequate accuracy, with recoveries ranging from 86.40 to 107.08%, limits of detection (LOD) from 1.76 to 6.71, limits of quantification (LOQ) ranging from 5.33 to 20.34, decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) ranging from 111.34 to 120.86 and the from 122.67 to 141.72 respectively. The results of the analysis of the broiler chicken muscle samples showed the presence of residues of antimicrobials at concentrations above the maximum residue levels (MRL) of each drug until the 36th day of rearing of the birds, that is, two days after the discontinuation of the medication. At the 38th day of rearing, the residue levels found were below the quantification limit of the method for the tested analytes. It was concluded that the UPLC/MS-MS method has the performance characteristics adequate and is suitable for detecting residues of enrofloxacin, ciprofloxacin, sulphaquinoxaline and oxytetracycline in broiler chicken muscle. Also, the residues of all studied antimicrobials are rapidly metabolized from broiler muscles, because after four days of withdrawal period, the levels found were lower than the limit of quantification of the method for the studied analytes.

Keywords: broiler chicken meat, residues, antimicrobial, validation, UPLC/MS-MS

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de carne de frango, em 2014, foi de 12,7 milhões de toneladas e, deste total, 4,1 milhões de toneladas foram destinadas ao mercado externo, o que manteve o Brasil como maior exportador mundial deste produto (ABPA, 2015). Os elevados índices de produtividade na avicultura estão diretamente ligados aos avanços tecnológicos na seleção genética e no manejo das aves e a busca pela máxima eficiência produtiva leva a uma contínua agregação de novas tecnologias pelo setor avícola. Essa característica tem feito com que a avicultura possua um dos melhores índices de produtividade entre os diversos segmentos da pecuária. Nesse sentido, a utilização de antimicrobianos e quimioterápicos, contribui para a busca de uma atividade mais rentável.

Os agentes antimicrobianos são substâncias químicas capazes de inibir o crescimento de micro-organismos ou eliminá-los. Em medicina veterinária, são utilizados em animais de produção na forma de agentes terapêuticos, profiláticos e também como aditivos químicos que funcionam como promotores de crescimento. O uso desses medicamentos no tratamento ou profilaxia é justificado pelo fato de os animais de produção estarem sujeitos à infecções devido às situações de confinamento e ao estresse a que são normalmente submetidos. Aliado a esse fato, a redução no custo dos antimicrobianos tornou compensatório o tratamento dos animais em massa (Gustafson e Bowen, 1997; Doyle, 2006). No entanto, a utilização desses medicamentos em produção animal tem sido questionada, pois a presença de seus resíduos em produtos de origem animal pode provocar reações alérgicas e ocasionar o aparecimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos (Bogialli e Corcia, 2009; Bondi et al., 2009).

Seguindo uma tendência mundial, os órgãos oficiais de saúde pública têm se posicionado contra o uso dos antimicrobianos na produção animal e a proibição do uso destes em rações é crescente, de acordo com as normas internacionais. Além das regulamentações que proíbem a utilização de alguns fármacos na produção animal, para garantir a segurança no consumo da carne de frango, é preciso respeitar o período de carência determinado para cada medicamento para que ocorra sua eliminação completa ou de seus resíduos pelo organismo do animal. As características farmacocinéticas, tais como a absorção, distribuição e eliminação, determinam as diferenças entre o tempo de depleção de cada droga e, conseqüentemente, os períodos de carência indicados para cada formulação (Cornejo et al., 2010). Apesar da sua importância, existem poucos estudos na literatura científica sobre a avaliação do tempo de depleção de antimicrobianos em frangos de corte. A maioria dos trabalhos disponíveis utilizam materiais radiomarcados e não empregam metodologias quantitativas e confirmatórias recomendadas pelas agências regulatórias para o estudo de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal.

O cálculo do período de carência é feito por um método estatístico proposto em 1995 pelo Comitê para Medicamentos Veterinários (*Committee for Veterinary Medicinal Products - CVMP*), que atua e regulamenta os assuntos relativos a medicamentos veterinários e refere-se ao tempo necessário para que a concentração de resíduos de uma determinada droga, ou de seus metabólitos, seja reduzida a níveis iguais ou inferiores ao nível de tolerância nos tecidos de 99% dos animais do lote (Paturkar et al., 2005; Doyle, 2006). Este nível de tolerância é compreendido como Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Os LMR são determinados por órgãos regulatórios, como o *Codex Alimentarius* e o Comitê de Produtos Alimentares da Agência Europeia de Medicina (EMEA). Valores de LMR cada vez menores têm sido estabelecidos à medida que metodologias de análise mais sensíveis são desenvolvidas. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é uma técnica analítica utilizada para análises de alimentos, devido a sua alta seletividade e sensibilidade. Esta técnica combina separação físico-química, realizada pela cromatografia líquida, com a análise de massas possibilitada pela espectrometria, e se tornou promissora por permitir a identificação de resíduos de antimicrobianos em níveis baixos.

Devido à preocupação com a segurança alimentar e o comércio internacional, a validação de métodos analíticos para utilização na área de análises de alimentos tem recebido muita atenção. Os resultados de análises obtidos por meio de métodos validados e confiáveis, subsidiam a formulação de políticas de saúde pública, visando à melhoria da qualidade dos alimentos destinados a população e possibilitando ao país, do ponto de vista sanitário, atender as exigências do comércio internacional (Souza, 2007).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- validar um método analítico quantitativo e confirmatório para pesquisa de resíduos de enrofloxacin e seu metabólito ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC/MS-MS);
- utilizar o método validado para realizar a pesquisa da presença e dos níveis de resíduos de medicamentos em amostras de músculo de frangos de corte que foram tratados com enrofloxacin, oxitetraciclina e sulfaquinoxalina e;
- determinar o período de depleção dos antibióticos utilizados para que não sejam detectados resíduos destes na carne, acima dos LMR.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a descoberta e o desenvolvimento dos primeiros antibióticos, antes da Segunda Guerra Mundial, essas drogas têm desempenhado um papel importante na medicina veterinária e humana, sendo utilizados desde 1950 como agentes antimicrobianos em animais de produção para fins terapêuticos, profiláticos e também como aditivos promotores de crescimento.

3.1. Enrofloxacin

A enrofloxacin é uma piperanil fluorociclopropil quinolona que possui amplo espectro de ação contra bactérias. Seu principal metabólito formado em espécies de animais de produção é a ciprofloxacina, um antimicrobiano utilizado em medicina humana (Heitzman, 1997; Palermo-Neto et al., 2011).

3.1.1. Modo de ação

O mecanismo de ação das quinolonas se dá pela inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, levando à morte das bactérias. Também inibem, *in vitro*, a topoisomerase IV, porém não é conhecido se este fato contribui para a ação antibacteriana (BRASIL, 2007).

3.1.2. Apresentações comerciais

Os produtos comerciais à base de enrofloxacin com registro de uso no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são: Baytril (Bayer S/A), Enflox (Sanphar Saúde Animal Ltda), Enro Flec (Vansil Indústria e Com. Representações Ltda), Enrofarm (Farmabase Saúde Animal Ltda), Enrofloxacin 98% (Indukern do Brasil Química Ltda), Enrofloxacin solução a 20% (Interchange Veterinária Indústria e Comércio Ltda), Enrofloxacin Tortuga 10% (Fabiani Saúde Animal Ltda), Enromaxi PS (Sauvet Indústria Farmacêutica e Veterinária Ltda), Enromic Oral (Laboratórios Microsules do Brasil S/A), Enromicil 10% solução (Amicil S/A- Indústria Comércio e Importação), Enro-Sell (Poly Sell Produtos Químicos Ltda), Enrotec (Fatec Indústria de Nutrição e Saúde Animal Ltda), Enrotril (Formil Química Ltda), Enroxina (Agrofarm Importadora e Exportadora de Produtos Veterinários Ltda) e Neoflox (Hipra Saúde Animal Ltda) (BRASIL, 2014).

3.1.3. Relações com outros medicamentos

A enrofloxacin possui efeito sinérgico quando associada aos aminoglicosídeos, cefalosporinas de terceira geração e penicilinas de amplo espectro contra algumas bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa* ou Enterobacteriaceae.

A utilização de enrofloxacin associada a complexos vitamínicos ou soluções que contenham ferro, zinco, manganês e cálcio, deve ser evitado, pois estas substâncias podem ser ligar ao grupo carboxil das quinolonas e diminuir significativamente sua atividade (Palermo-Neto et al., 2011).

3.1.4. Indicações de uso

A enrofloxacin, devido a seu amplo espectro de ação, é recomendada para tratar aves de infecções por *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, coriza infecciosa das galinhas, infecções por *Ornithobacterium rhinotracheale*, celulite por Gram-negativos, estafilococose, salmoneloses, dentre outras infecções (Ito et al., 2005).

3.1.5. Período de retirada

Para avaliação do tempo de depleção da enrofloxacin, Heitzman (1997) realizou um estudo utilizando 20 frangos de corte com 14 dias de idade que receberam enrofloxacin radiomarcada na dosagem de 12 mg kg⁻¹ durante sete dias consecutivos. Após a retirada do medicamento, os animais foram eutanasiados em cinco períodos diferentes (seis horas, 24 horas, três dias, sete dias e dez dias). Em cada período foram eutanasiados quatro animais, e amostras de fígado,

músculo, pele e gordura foram coletadas para avaliação da presença de resíduos do medicamento. As concentrações medicamentosas observadas no fígado foram de 2335 ± 474 ; 194 ± 82 ; 29 ± 12 ; $12 \pm 4 \mu\text{g kg}^{-1}$; no músculo foram encontradas as concentrações de 748 ± 178 ; 52 ± 16 ; 11 ± 3 ; $3 \pm 2 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto na gordura os valores obtidos foram de 181 ± 58 ; 56 ± 31 ; 30 ± 33 ; $12 \pm 12 \mu\text{g kg}^{-1}$ após seis horas, 24 horas, três dias e sete dias, respectivamente. Aos dez dias, não foram detectados resíduos do medicamento no fígado, músculo e gordura. Na pele, as concentrações encontradas foram de 547 ± 59 ; 391 ± 39 ; 214 ± 47 ; 90 ± 37 e $94 \pm 37 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante os cinco períodos de avaliação. Segundo Landoni e Albarellos (2015) o período de retirada da enrofloxacinina varia de três a sete dias para frangos de corte.

3.1.6. Legislação mundial e brasileira

O uso de enrofloxacinina para animais de produção é proibido nos Estados Unidos (Goetting et al., 2011), e na União Europeia sua aplicação não é indicada para poedeiras (EC, 2009).

A autorização de uso de enrofloxacinina no tratamento de infecções em frangos de corte foi suspensa pelo FDA em 2005, com a justificativa de que a utilização de fluorquinolonas em frangos de corte leva ao desenvolvimento de *Campylobacter* spp. resistentes à estes antimicrobianos. A transferência de *Campylobacter* spp. resistentes às fluorquinolonas dos frangos de corte para o homem é uma causa importante para o aumento do número de infecções por *Campylobacter* spp. resistentes em seres humanos (FDA, 2005; Landoni e Albarellos, 2015).

3.1.7. Toxicidade

O produto pode ser administrado para frangos de corte com ampla margem de segurança em uma dosagem de 10 a 12 mg kg⁻¹ por via oral. Possui uma boa tolerância geral, em todas as espécies animais, sendo bem tolerado pelas aves (Landoni e Albarellos, 2015).

3.2. Sulfaquinoxalina

As sulfonamidas são fármacos derivados da sulfanilamida, que tem estrutura similar à do ácido para-aminobenzóico (PABA), e foram os primeiros antimicrobianos eficazes utilizados por via sistêmica, na prevenção e cura das infecções bacterianas, tanto no homem quanto nos animais. Embora sejam um dos mais antigos agentes quimioterapêuticos utilizados para a terapia antimicrobiana, as sulfonamidas são ainda muito úteis para o tratamento ou prevenção de coccidioses em frangos de corte. As sulfonamidas e diaminopirimidinas, ambos inibidores da síntese de ácido fólico, são drogas bacteriostáticas, mas quando combinadas, sua ação é potencializada, agindo como bactericidas, sendo ativas contra *E. coli* e *Pasteurella multocida* (Górniak, 2011).

3.2.1. Modo de ação

Este quimioterápico é um análogo estrutural do PABA, que é uma substância essencial para a síntese de ácido fólico, o qual, em sua forma reduzida (ácido tetraidrofólico) é fundamental para a síntese de DNA e RNA dos micro-organismos. Desta maneira, as sulfonamidas atuam como um antimetabólito (De La Cruz, et al., 2011; Górniak, 2011).

3.2.2. Apresentações comerciais

Os produtos comerciais à base de sulfaquinoxalina com registros no MAPA e autorizados no Brasil são Coccibac-SDT Premix (Interchange Veterinária Indústria e Comércio Ltda), Coccidine (Sanphar Saúde Animal Ltda), Coccimix (Chemitec Agro Veterinária Ltda), Coccirex SQX (Laboratório Bio-Vet S.A), Coccisal Solução Oral (Interchange Veterinária Indústria e Comércio Ltda), Sulfacox Des-Vet (Des-Far Laboratórios Ltda), Sulfaquinoxalina 25% (Interchange Veterinária Indústria e Comércio Ltda), Sulfaquinoxalina Duprat (Laboratórios Duprat Ltda), Sulfaquinoxalina Mcassab (M. Cassab Comércio e Indústria Ltda) e Sulfaquinoxalina Vansil (Vansil Indústria e Com. Representações Ltda) (BRASIL, 2014).

3.2.3. Relações com outros medicamentos

Interação metabólica entre ionóforos e sulfonamidas já foi relatada. Como os ionóforos são inibidores das enzimas CYP3A, isto pode resultar em menor metabolismo das sulfonamidas após a co-medicação (Ershov et al., 2001).

Outras interações medicamentosas são o sinergismo com eritromicina e com o trimetoprim, podendo também, potencializar os efeitos da fenilbutazona. Anestésicos locais, análogos do PABA, podem antagonizar seus efeitos (Costa-Batllori, 1996).

3.2.4. Indicações de uso

As sulfonamidas são indicadas para a prevenção de coccidiose ou tratamento de surtos. Estes medicamentos podem ser administrados também para o controle de pulorose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas (Hoff, 2008).

3.2.5. Período de retirada

A associação da eliminação de sulfonamidas nas fezes e na urina com o hábito de coprofagia dos frangos de corte pode levar ao aumento do tempo de permanência da droga no organismo animal. Desta maneira, para evitar a presença de resíduos nos tecidos comestíveis, em concentrações acima do LMR, é aconselhável aumentar o período de retirada das sulfonamidas, sendo indicado o período de carência mínimo de dez dias (Landoni e Albarellos, 2015).

3.2.6. Toxicidade

As sulfonamidas têm, em frangos de corte, uma estreita margem de segurança, desta forma, sua utilização é limitada. Efeitos tóxicos característicos que podem ser observados em aves incluem supressão da medula óssea, trombocitopenia, depressão linfóide e imunológica. Em determinadas circunstâncias podem causar diminuição da taxa de crescimento de frangos de corte e perus; por esta razão devem ser utilizadas com muito critério. Alterações *post-mortem* incluem infartos hemorrágicos no fígado e no baço, medula óssea pálida e hemorragias petequiais ou equimoses nos músculos (Daft et al., 1989).

A associação das sulfonamidas com as diaminopiridinas (trimetoprim e ormetoprim) reduz riscos de toxicidade porque se pode diminuir a dose da sulfa. As diaminopiridinas são pouco tóxicas, mas podem causar, somente quando utilizadas em doses muito elevadas, deficiência de ácido fólico e hipercalcemia (Furusawa and Tsuzukida, 1998; Furusawa and Hanabusa, 2002).

3.3. Oxitetraciclina

As tetraciclina mais comumente utilizadas na avicultura são clortetraciclina, tetraciclina e oxitetraciclina. Estas substâncias são ativas contra bactérias, protozoários e micro-organismos intracelulares anaeróbicos tais como *Mycoplasma* e *Chlamydia* spp. As diferenças quanto ao espectro de ação destas drogas são devidas, principalmente, a seu grau de solubilidade lipídica (Landoni e Albarellos, 2015).

3.3.1. Modo de ação

A oxitetraciclina é um antimicrobiano bacteriostático que interfere na síntese de proteínas (Landoni e Albarellos, 2015). As tetraciclina se ligam a um sítio na subunidade 30S do ribossomo bacteriano bloqueando a ligação do aminoacil do RNA transportador ao complexo ribossomo-RNA mensageiro, impedindo a adição de aminoácidos e, conseqüentemente, a síntese proteica (Palermo-Neto et al., 2011; Shlaes, 2006).

3.3.2. Apresentações comerciais

Os produtos comerciais com registro de uso no MAPA são: Oxitac-200 (Fatec Indústria de Nutrição e Saúde Animal Ltda), Terramicina (Laboratórios Pfizer Ltda), Tormicina (Fabiani Saúde Animal Ltda), Otc 23% Mc (M. Cassab Comércio e Indústria Ltda), Oxitetraciclina 50% Ps (Indústria Farmacêutica Vitalfarma Ltda), Oxitetraciclina 10 Premix (Des Far Laboratorios Ltda) e Oxitetraciclina cloridrato (Des Far Laboratórios Ltda) (BRASIL, 2014).

3.3.3. Relações com outros medicamentos

A associação de oxitetraciclina, na concentração de 15 mg kg⁻¹ com ácido-3-nitro ou com a sulfaquinoxalina aumenta o tempo de coagulação sanguínea, podendo provocar hemorragias musculares. Quando associado com monensina ou roxarsona pode causar diarreia metabólica. Além disso, as tetraciclina podem formar quelatos com cátions bivalentes e trivalentes, particularmente cálcio, magnésio, alumínio e ferro. Desta maneira, a concentração de cálcio e magnésio na dieta das aves é um dos principais fatores que pode interferir na absorção intestinal da droga (Harms Waldroup, 1961; Landoni e Albarellos, 2015).

3.3.4. Indicações de uso

As tetraciclina são indicadas para o tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp., colibaciloses, doença crônica respiratória, micoplasmoses, aerossaculites provocadas por *E. coli*, infecções por *Pasteurella multocida* e *Haemophilus paragallinarum* (Landoni e Albarellos, 2015).

3.3.5. Período de retirada

Segundo Landoni e Albarellos (2015), o período de retirada da oxitetraciclina é de sete dias.

3.3.6. Toxicidade

Apesar de serem antimicrobianos farmacologicamente seguros para as aves, as tetraciclina podem provocar irritação gástrica e duodenal, aumentando a regurgitação enterogástrica quando administradas por via oral, ou causando necrose tecidual quando administradas por via

intramuscular ou subcutânea. Podem levar também a alteração da microbiota intestinal podendo causar disbiose, candidíase (perus), diarreia e colonização por salmonelas paratífóides. Devido sua habilidade de se ligar ao cálcio, podem causar problemas cardiovasculares e interferir na mineralização dos ossos. No rim, a oxitetraciclina pode levar à necrose tubular e, favorecer a manifestação secundária dos efeitos tóxicos sobre o fígado, provocando esteatose (Palermo-Neto et al. 2011).

3.4. Regulamentações sobre a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal

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

Existem diversas organizações envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle da utilização de medicamentos veterinários na produção animal. Esses mecanismos incluem controle da distribuição e o uso em animais, a determinação de níveis seguros de resíduos nos alimentos de origem animal e as metodologias empregadas para detecção e quantificação de resíduos (Mitchell et al., 1998). Entretanto, as legislações podem diferir consideravelmente entre diferentes países, especialmente em regiões em desenvolvimento, quando, em muitos casos, órgãos reguladores ainda estão sendo criados e desenvolvidos. Além disso, LMRs não são estabelecidos para todos os antibióticos encontrados em produtos de origem animal (Spinosa e Tárraga, 2011).

Com a finalidade de proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, foi criado, em 1963, o *Codex Alimentarius*, um Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da normalização sobre alimentos. O *Codex* é responsável pela análise crítica da literatura existente sobre a toxicidade de cada antimicrobiano usado como medicamento veterinário fixando as ingestões diárias aceitáveis (IDA) e os respectivos LMR (Paschoal et al., 2008; Cunha, 2009; Palermo-Neto et al., 2011; *Codex Alimentarius*, 2015).

Na década de 70, o Brasil tornou-se membro deste Programa e em 1980 foi criado o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), por meio das Resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO). O CCAB tem como principais finalidades a participação, em representação do país, nos Comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas *Codex* como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos.

Outros órgãos internacionais incluem o Comitê de Produtos Alimentares da Agência Europeia de Medicina (*European Agency for the Evaluation of Medical Products* - EMEA) e a Organização Mundial de Saúde Animal (*Office International des Epizooties* - OIE). Além destes, alguns países têm grupos de especialistas envolvidos, como a Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drugs Administration* - FDA), nos Estados Unidos, o Departamento de Medicamentos Veterinários (*Bureau of Veterinary Drugs*), no Canadá, e a

Comissão de Produtos Veterinários do Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (*Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods*), na Inglaterra (Caldeira, 2012).

No Brasil, foi instituído o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) com o objetivo de inspecionar e monitorar, baseando-se em análise de risco, a presença de resíduos de substâncias químicas que podem ser nocivas ao consumidor. Esse plano foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de Agosto de 1995, e contém tabelas que regulamentam o controle de antimicrobianos, de anabolizantes, de micotoxinas, de sulfonamidas, de metabólitos de nitrofuranos e de avermectinas, entre outros, nos produtos de origem animal (BRASIL, 1986; BRASIL, 1995). Segundo a Instrução Normativa nº 42, de 1999, a competência para estabelecer os LMR em alimentos, seja de medicamentos veterinários, agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1999). No caso de não estarem estabelecidos, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Europeia, ou ainda, os adotados pelo FDA (Cunha, 2009).

A Comissão Europeia, por meio do Regulamento nº 37/2010 estabeleceu os LMR em produtos de origem animal relativos às substâncias farmacologicamente ativas em diferentes matrizes (Tab. 1) e em 2015, os LMR de medicamentos veterinários em produtos de origem animal foram atualizados pela Comissão do *Codex Alimentarius* (Tab. 2) (EC, 2009; CODEX, 2015).

Tabela 1. Limites máximos de resíduos para agentes antimicrobianos segundo o Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia em tecidos de aves

Substância farmacologicamente ativa	LMR de acordo com os tecidos-alvo de aves ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	Músculo	Tecido adiposo	Fígado	Rim
Ácido oxolínico	100	50	150	150
Amoxicilina	50	50	50	50
Ampicilina	50	50	50	50
Avilamicina	50	100	300	200
Benzilpenicilina	50	50	50	50
Kanamicina	100	100	600	2500
Clortetraciclina	100	-	300	600
Cloxacilina	300	300	300	300
Colistina	150	150	150	200
Danofloxacina	200	100	400	400
Dicloxacilina	300	300	300	300
Difloxacina	300	400	1900	600
Doxiciclina	100	300	300	600
Enrofloxacina	100	100	200	300
Espectinomicina	300	500	1000	1500
Espiramicina	200	300	400	-
Florfenicol	100	200	2500	750
Flumequina	400	250	800	1000
Lasalocida	60	300	300	150
Lincomicina	100	50	500	1500
Neomicina	500	500	5500	9000
Oxacilina	300	300	300	300
Oxitetraciclina	100	-	300	600
Sarafloxacina	-	10	100	-
Sulfonamidas	100	100	100	100
Tetraciclina	100	-	300	600
Tiamulina	100	100	1000	-
Tianfenicol	50	50	50	50
Tilmicosina	50	50	1000	1000
Tilosina	100	100	100	100
Tilvalosina	-	50	50	-

Tabela 2. Antimicrobianos e seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR) de acordo com o *Codex Alimentarius*

Antimicrobiano	LMR de acordo com os tecidos-alvo de aves ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	Músculo	Tecido adiposo	Fígado	Rim
Avilamicina	200	200	300	200
Benzilpenicilina	50	-	50	50
Oxitetraciclina	} 200	-	600	1200
Clortetraciclina				
Tetraciclina				
Colistina	150	150	150	200
Danofloxacina	200	100	400	400
Dihidroestreptomicina	} Soma 600	Soma 600	Soma 600	Soma 100
Estreptomicina				
Eritromicina	100	100	100	100
Flumequina	500	1000	500	3000
Lincomicina	200	100	500	500
Neomicina	500	500	500	10000
Sarafloxacina	10	20	80	80
Espectinomicina	500	2000	2000	5000
Espiramicina	200	300	600	800
Tilmicosina	150	250	2400	600
Tilosina	100	100	100	100

O escopo analítico, os limites de tolerância e a amostragem do PNCRC do MAPA, para o ano de 2015, encontram-se descritos na Tab. 3 (BRASIL, 2015a).

Tabela 3. Antimicrobianos e seus limites de referência estabelecidos pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para o ano de 2015

Matriz músculo de ave		Matriz rim de ave	
Analito	Limite de referência ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Analito	Limite de referência ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Nitrofurazona	1 ^(a)	Lincomicina	500
Furazolidona	1 ^(a)	Eritromicina	100
Furaltaona	1 ^(a)	Tilosina	100
Nitrofurantoina	1 ^(a)	Neomicina	10000
Cloranfenicol	0,3 ^(a)	Estreptomicina	1000
Oxitetraciclina	} Soma igual a 200	Espectinomicina	5000
Tetraciclina		Dihidroestreptomicina	1000
Clortetraciclina		Kanamicina	2500
Doxiciclina	100	Apramicina	1000
Sulfaclorpiridazina	} Soma igual a 100	Gentamicina	500
Sulfadoxina		Tobramicina	500
Sulfamerazina		Higromicina	500
Sulfadiazina		Tilmicosina	600
Sulfametoxazol		Amicacina	500
Sulfatiazol		Clindamicina	200
Sulfametazina		Ampicilina	50
Sulfaquinoxalina		Cefazolina	50
Sulfadimetoxina		Oxacilina	300
Ácido Oxolínico	100	Penicilina G	50
Ácido Nalidíxico	20	Penicilina V	25
Flumequina	500	Oxitetraciclina	} Soma 1200
Enrofloxacina	} Soma igual a 100	Tetraciclina	
Ciprofloxacina		Clortetraciclina	
Sarafloxacina	10	Doxiciclina	600
Difloxacina	300		
Danofloxacina	200		

(a) Substância de uso proibido. O valor indicado na tabela corresponde ao Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de referência para a análise. O LMDR é o limite de referência para tomada de ação.

3.5. Métodos analíticos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos

Os métodos analíticos para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal devem ser capazes de detectar com segurança a presença de uma substância de interesse, determinar sua concentração e identificar de forma inequívoca o analito de interesse.

Métodos de triagem podem ser de natureza qualitativa ou semi-quantitativa, e são utilizados para identificar a presença (ou ausência) de resíduos, em amostras de um lote, cuja concentração exceda o LMR ou outro limite que implique ações regulatórias por parte de uma autoridade competente. Esses métodos não fornecem informações estruturais suficientes para definir com precisão a concentração da substância presente, no entanto, podem ser utilizados para determinar rapidamente se as amostras analisadas requerem testes adicionais ou se podem ser liberadas. Os métodos de triagem devem apresentar uma taxa de resultados falso-negativos inferior a 5% de acordo com a Decisão 2002/657/EC, e não devem ser utilizados isoladamente para fins de controle de resíduos em amostras oficiais sem que haja disponibilidade de métodos quantitativos e/ou confirmatórios devidamente validados para serem aplicados a quaisquer amostras identificadas como potencialmente não conformes em relação a um LMR estabelecido (EC, 2002; CODEX, 2009).

Os métodos quantitativos fornecem informação quantitativa que pode ser usada para determinar se os resíduos presentes em uma determinada amostra excedem o LMR, mas não permitem a confirmação inequívoca da identidade do resíduo. Esses métodos devem apresentar um bom controle estatístico dentro da faixa de trabalho na qual se enquadra o LMR ou limite de ação regulatória (CODEX, 2009).

Os métodos confirmatórios possibilitam a identificação inequívoca das substâncias analisadas e podem também confirmar a concentração presente. Os métodos de confirmação são baseados em técnicas de cromatografia associadas à espectrometria de massas, tais como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS). Tais métodos, quando usados para a confirmação da identidade dos resíduos, devem fornecer informações estruturais confiáveis dentro de limites estatísticos estabelecidos (CODEX, 2009).

3.5.1. Métodos físico-químicos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos

3.5.2. Cromatografia

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. No caso da cromatografia gasosa o fluido é um gás e na cromatografia líquida o fluido é um solvente. Na cromatografia líquida a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é percorrida pela fase móvel. As forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto, a separação dos solutos individuais (Skoog et al., 2002).

Na cromatografia líquida clássica (CLC) o recheio da coluna é utilizado geralmente uma só vez, porque parte da amostra usualmente se adsorve de forma irreversível. O enchimento da coluna deve ser repetido para cada separação. A vazão de eluente na CLC é promovida pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas manualmente ou através de um

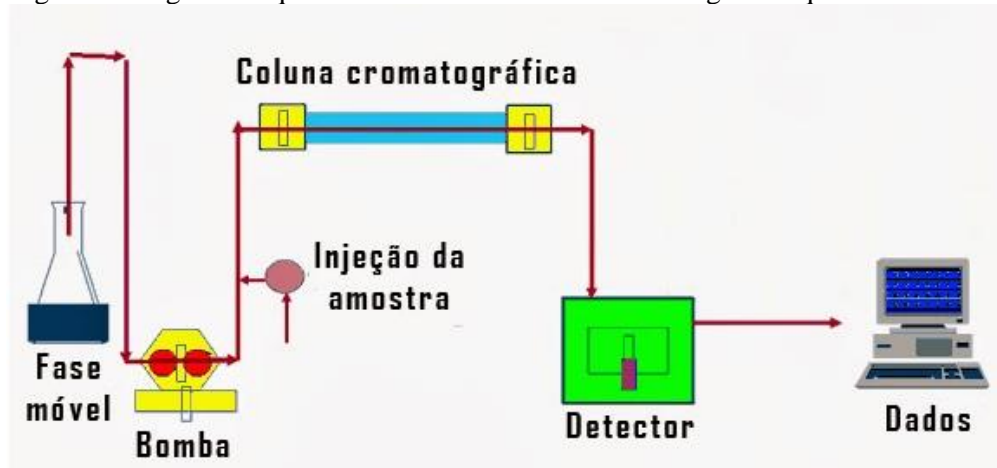
coletor de frações. As separações requerem, geralmente, várias horas e a detecção e a quantificação das frações são realizadas por análise manual.

Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é empregada uma coluna fechada, reaproveitável. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada resultando em operações mais reprodutíveis, que tornam as análises executadas mais precisas. Vários tipos de detectores, que podem ser colocados na saída da coluna, proporcionam uma identificação e quantificação contínua dos componentes da amostra. Desta maneira, a HPLC tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Lanças, 1993).

A fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel e estas 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 (Penteado et al., 2008).

O sistema HPLC é constituído basicamente por um reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, um sistema de introdução da amostra, coluna cromatográfica, sistema de detecção e um sistema de registro e tratamento dos dados (Fig. 1). Por meio da válvula de introdução ou injeção, a amostra é carregada pela fase móvel até a coluna, onde é realizado o processo de separação. O efluente da coluna segue então para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado, tratado no computador, e um cromatograma é montado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (Dong, 2006; Snyder e Kirkland, 2009).

Figura 1. Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência



Na HPLC, podem ser utilizados vários detectores, como: ultravioleta (UV), índice de refração, espalhamento de luz, fluorescência e eletroquímico, que aliados a softwares dedicados, permitem a análise quantitativa dos componentes das misturas em concentrações extremamente baixas. No entanto, apesar de tais características, a utilização desta como técnica de identificação é bastante limitada, pois mesmo com grandes esforços obtidos pelo uso de colunas de diferentes polaridades, desenvolvimento de sistemas de índices de retenção e outros artifícios, a análise qualitativa pode estar sujeita a erros devido à utilização dos tempos de retenção para a identificação dos analitos. Apesar do tempo de retenção ser característico de um composto em um determinado método, ele não é único, ou seja, outros compostos podem ter o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas empregadas. Assim, pode ocorrer coeluição de vários analitos e o pico a ser identificado pode não corresponder apenas ao analito de interesse (Lanças, 2009).

Buscando a melhoria na seletividade, a tentativa inicial foi de se utilizar um detector fotométrico que pudesse ser operado nas regiões ultravioleta e visível (UV-vis) do espectro e fosse capaz de monitorar dois comprimentos de onda diferente (normalmente 220 nm e 254 nm). Nesse processo, a razão entre o sinal obtido com um padrão analítico nos dois comprimentos de onda deveria ser a mesma que aquela obtida na análise das amostras contendo o analito de interesse. A necessidade de conhecimento prévio do analito alvo é uma das limitações dessa técnica, pois ela não pode ser utilizada para a detecção de compostos desconhecidos. O desenvolvimento dos detectores UV-vis de comprimento de onda variável permitiu a obtenção de espectros completos de analitos alvo nesta região espectral. Apesar de ter representado um avanço em relação às situações anteriores, os espectros obtidos para uma grande quantidade de analitos presentes em amostras complexas eram de pouco auxílio devido à falta de seletividade dos mesmos e a similaridade entre vários dos compostos em análise (Lendia e Meyer, 2005).

O desenvolvimento dos detectores baseados em arranjos de fotodiodos (DAD), nos quais são gerados espectros tridimensionais de absorvância dos analitos alvo foi considerado um avanço por permitir avaliar a pureza de picos cromatográficos. Apesar desta evolução em relação à situação existente no início do desenvolvimento da técnica, a identificação positiva dos picos cromatográficos ainda era uma situação difícil, na maioria dos casos (McMaster, 2005; Niessen, 2006).

3.5.3. Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)

O desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) representou um avanço das técnicas de HPLC, e surgiu da necessidade de análises cromatográficas mais rápidas, sem o comprometimento do desempenho analítico. A redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas foi, inicialmente, a alternativa mais atrativa, porém estas alterações ficaram limitadas devido à elevada pressão resultante desta redução, que não é compatível com os sistemas HPLC convencionais. Entretanto, com o desenvolvimento dos sistemas de UPLC, o uso de colunas com partículas menores que 2 µm tornou-se possível, aumentando a eficiência das análises (Maldaner e Jardim, 2011).

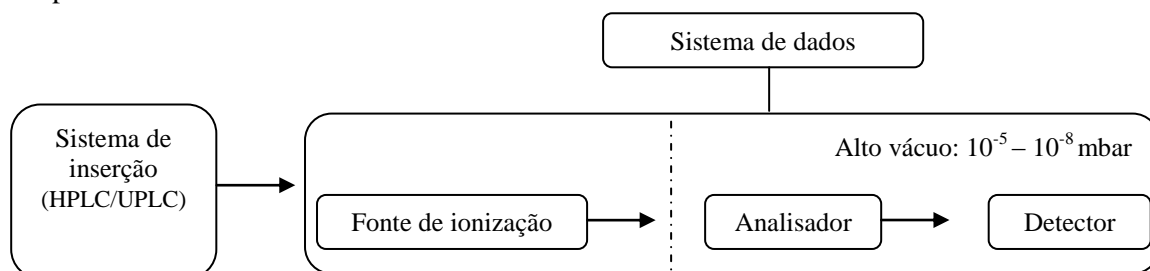
Dentre as principais características dos sistemas de UPLC, que permitiram a utilização de colunas com menores tamanhos de partícula, estão a capacidade de trabalhar em altas pressões, volumes internos reduzidos, a presença de sistemas de bombeamento robustos, o desenvolvimento de detectores com alta taxa de aquisição, colunas resistentes e injetores com

precisão na faixa de volumes pequenos. Outra vantagem dos sistemas UPLC, é que a redução do tempo de análise, devido à maior eficiência do sistema, proporciona uma considerável economia de solvente (Maldamer e Jardim, 2009; Nováková e Vlcková, 2009; Núñez et al., 2012).

3.5.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) é uma metodologia analítica para a determinação de compostos orgânicos. Os compostos presentes em matrizes complexas, tais como amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos podem ser determinados sem a presença de interferentes e com limites de detecção muito baixos (Ardrey, 2003). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC/MS-MS) permite um aumento de seletividade e sensibilidade, proporcionando o monitoramento de centenas de resíduos em uma única análise. Apesar do alto custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, eles apresentam uma série de vantagens, como a alta eficiência analítica, menor tempo no desenvolvimento de métodos e elevada robustez (Prestes et al., 2009). Além disso, a técnica fornece a massa molar, informações estruturais e permite a análise quantitativa do analito (Skoog et al., 2002). Os componentes básicos de um espectrômetro de massas são a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector (Fig. 2).

Figura 2. Componentes básicos de um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas



O acoplamento da HPLC à MS, foi um processo demorado devido à algumas incompatibilidades, tais como o fluxo normalmente empregado nos sistemas de HPLC. As vazões utilizadas em HPLC são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), portanto a transferência direta do eluente da coluna cromatográfica para a fonte de ionização do espectrômetro de massas, que é operado em um sistema de vácuo, era impossibilitada. Além do problema relacionado à vazão, os compostos separados por HPLC são normalmente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura. Desta maneira, foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização compatíveis com esta técnica (Vékey, 2001; Ardrey, 2003; Lacorte e Fernández-Alba, 2006).

3.5.4.1. Fontes de ionização

Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas para as análises de resíduos em alimentos são as fontes de ionização à pressão atmosférica (API, *Atmospheric pressure ionization*), que incluem a ionização por eletronebulização (ESI, *electrospray*), a ionização química à pressão atmosférica (APCI, *Atmospheric pressure chemical ionization*) e a

fotoionização à pressão atmosférica (APPI, *Atmospheric pressure photoionization*) (Vékey, 2001; Smeraglia et al., 2002; Bos et al., 2006).

Na ESI, a fase móvel eluente do sistema de HPLC, na qual se encontram os analitos de interesse, passa por um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. O ESI pode ser operado no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. Na saída do capilar são formadas gotículas altamente carregadas que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. À medida que ocorre a dessolvatação, que é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂), o tamanho das gotículas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada "fissão coulômbica", que gera gotículas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas iniciais. Este processo continua até que sejam produzidos íons do analito, os quais são transferidos para o analisador por uma série de dispositivos de focalização (Vékey, 2001; Smeraglia et al., 2002; Ardrey, 2003).

Como a ESI ocorre diretamente no capilar, esta 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; Ardrey, 2003). Esta fonte de ionização, ideal para a análise de moléculas mais polares, é muito aplicada para determinações de proteínas, aminoácidos e várias substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (Lanças, 2009).

Na utilização desta fonte de ionização, o emprego de divisores de fluxo, que tem como função diminuir a vazão do eluente para o interior da interface, é necessário quando o fluxo utilizado no cromatógrafo for superior a 1 ou 0,5 mL min⁻¹ no caso de fase móvel com elevada porcentagem de água em sua composição. Como a ESI é dependente da concentração do analito no eluente da coluna cromatográfica, o uso desses divisores de fluxo, não afeta, de forma notável, sua detectabilidade (Vékey, 2001).

Outra técnica de ionização disponível é a APCI, que tem sido utilizada principalmente para a análise de moléculas não polares e mais voláteis, as quais não apresentam as características desejáveis para serem convertidas em íons na fase gasosa a partir de uma fase condensada, como o eluente de um sistema de HPLC. Nesta técnica, 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 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, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (Vékey, 2001; Smeraglia et al., 2002; Ardrey, 2003). Esta técnica de ionização suporta a utilização de fluxos mais altos (0,5 a 2,0 mL min⁻¹) no sistema cromatográfico quando comparado a ESI (Ardrey, 2003).

Tanto a ESI quanto a APCI são consideradas ionizações brandas, ou seja, a partir destas técnicas são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M^+H]^+$ no modo positivo ou $[MH]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito (Vékey, 2001; Smeraglia et al., 2002; Ardrey, 2003).

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 radicalar do tipo M^+ . Este processo é denominado fotoionização direta. A probabilidade de ocorrer a fotoionização direta é baixa, uma vez que os fótons de UV têm uma baixa penetração numa mistura densa de gases e vapores à pressão atmosférica. Entretanto, se for empregada uma alta concentração de uma substância que é facilmente ionizada (um dopante) é possível aumentar significativamente o número de íons gerados pela fotoionização inicial do dopante e subsequente troca de carga com o analito, desde que a afinidade eletrônica do analito seja maior que a do dopante. Mas, se a afinidade protônica do analito é maior que a afinidade protônica do íon dopante desprotonado, moléculas do solvente ou clusters podem agir como intermediários entre o íon dopante e o analito pela abstração de um próton do íon dopante, passando este para o analito. No entanto, a APPI não é limitada ao modo de ionização positivo. A formação de íons negativos na APPI é iniciada pela formação de elétrons térmicos durante a fotoionização do solvente e do gás oxigênio por meio da transferência de próton ou troca de carga, ou ainda por captura de elétrons ou reações de substituição. Portanto, tanto na formação de íons positivos quanto negativos por APPI, o analito é analisado de forma indireta, por meio de reações químicas foto-iniciadas (Bos et al., 2006).

A APPI permite a análise de compostos apolares e de baixa polaridade, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A detectabilidade em APPI é comparável à APCI, quando são empregadas altas vazões do eluente e é superior, quando são utilizadas baixas vazões. Esta fonte de ionização é também menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença de tampões no eluente que a ESI e a APCI (Bos et al., 2006).

3.5.4.2. Analisadores de massas

O efluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado, geralmente à pressão atmosférica (API) por um dos processos descritos no item anterior (ESI, APCI ou APPI), é direcionado para o analisador de massas. Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z (Lanças, 2009).

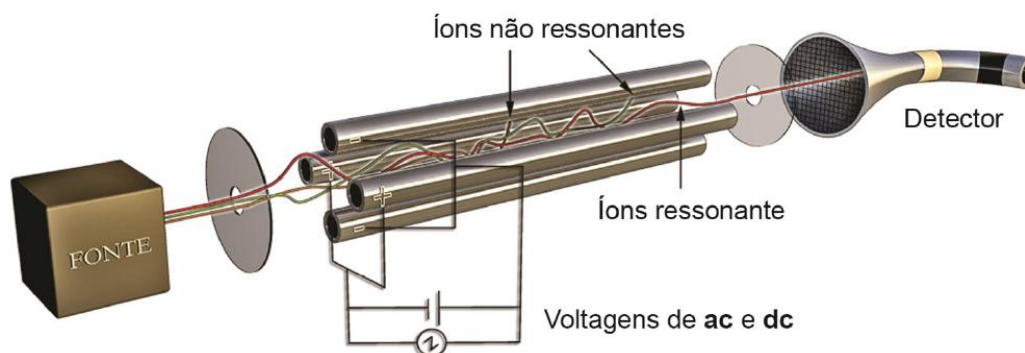
As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios e limitações. Apesar da existência de diferentes analisadores de massas, a escolha do mais apropriado deve ser efetuada considerando-se a aplicação, como, por exemplo, a faixa de massas desejada, o desempenho desejado, relacionado principalmente à resolução e o custo, que pode variar em função do tipo de analisador e das interfaces de cada equipamento. Dentre os analisadores disponíveis, os mais aplicados nas análises de resíduos em produtos de origem animal são do tipo quadrupolo, tempo de voo (ToF) e ion trap (Lanças, 2013).

3.5.4.2.1. Quadrupolo

O quadrupolo tem como principal vantagem a simplicidade, facilidade de operação, preço relativamente baixo e a boa linearidade em análises quantitativas. Apesar de usualmente utilizado com resolução baixa (tipicamente $R = 1.000$), esta pode ser aumentada em condições favoráveis para valores superiores a 4.000. Sua exatidão de massas encontra-se, geralmente, entre 0,1 e 0,2 unidades de massa atômica (Dalton) e a faixa de massas, usualmente entre 10 e 4.000 Da (Lanças, 2013).

O quadrupolo 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 massa/carga (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 (Fig. 3) (Lanças, 2009).

Figura 3. Esquema de um analisador quadrupolar



Fonte: Lanças, 2009

3.5.4.2.2. Analisador de tempo de voo (Time of flight) – ToF

Em um analisador do tipo tempo de voo (ToF, *time of flight*), os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo denominado usualmente “*drift tube*”, após o qual atingem o detector. A *velocidade* alcançada pelo íon acelerado é proporcional à raiz quadrada de sua razão m/z – por simplicidade, assume-se ser inversamente proporcional à massa. De forma análoga, o *tempo* necessário para um íon atravessar o tubo será inversamente proporcional à raiz quadrada da razão m/z – também por simplicidade, é comum assumir-se que o mesmo é proporcional à massa – uma vez que a distância entre a formação do íon e o detector é fixa (depende do comprimento do tubo) (Lanças, 2013).

O princípio de operação do ToF baseia-se na medida do “tempo de voo” de um íon dentro do espectrômetro de massas. Uma vez que as dimensões do tubo e a energia cinética dos íons são bem conhecidas, o cálculo da razão m/z torna-se simples (Lanças, 2009). O desenvolvimento de um refletor (também conhecido como espelho de íons, espelho eletrônico ou *reflectron*) e o uso de técnicas ortogonais de introdução dos íons (o-ToF) contribuem para a melhoria da resolução, por meio de um aprimoramento no controle ou compensação do espalhamento inicial de energia, e na distribuição espacial dos íons.

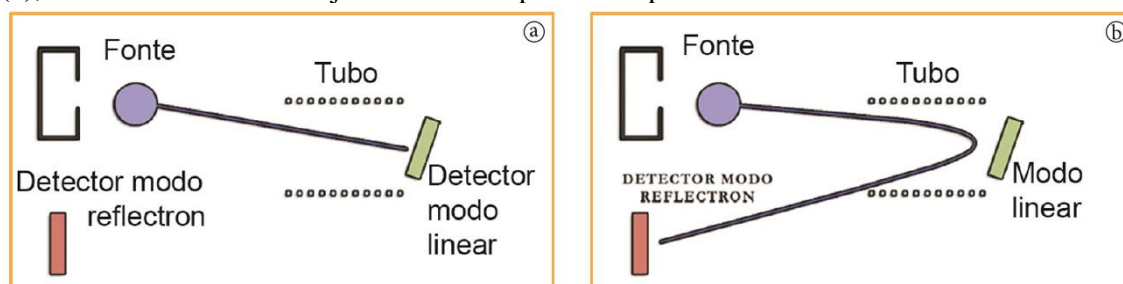
O *reflectron* utiliza um campo elétrico aplicado a uma série de grades ou eletrodos (também denominados pratos ou discos) para reverter a direção da trajetória dos íons que nele entram. Por meio desse dispositivo, os íons de mesma razão m/z chegam ao mesmo tempo no detector, ainda que apresentem diferenças em sua energia cinética.

A Fig. 4 ilustra o esquema genérico de um analisador do tipo ToF com refletor. A parte “a” da figura mostra um íon formado na fonte sendo acelerado no tubo em direção ao detector, sem ajuda do *reflectron*. Na parte “b” da mesma figura, o *reflectron* é ligado, observando-se que a trajetória do íon agora será curva, a dispersão dos íons de mesma razão m/z é diminuída e a resolução aumentada, e os íons retornam ao *drift tube* antes de serem detectados (Lanças, 2013).

Vários desenvolvimentos conduziram a refletores modernos com elevado desempenho, com considerável redução no tamanho do equipamento e melhoria da focalização dos íons, sendo amplamente empregados nos analisadores do tipo ToF mais modernos (Lanças, 2009).

Além do uso do *reflectron*, outra forma de aumentar a resolução utilizando analisador do tipo ToF é com o uso de geometria ortogonal (o-ToF). Nesse sistema os íons são produzidos de forma contínua na fonte de ionização (electrospray, por exemplo), acelerados e focalizados com ajuda de lentes apropriadas. A seguir, aplica-se uma aceleração pulsada ortogonal (perpendicular) ao movimento dos íons (oa, *ortogonal acceleration*), os quais irão adquirir velocidades que são independentes das velocidades adquiridas por sua aceleração na fonte (Lanças, 2013).

Figura 4. Esquema simplificado de um ToF com o *reflectron* fora de operação (a) e em operação (b), ilustrando a curva na trajetória dos íons provocada pelo refletor



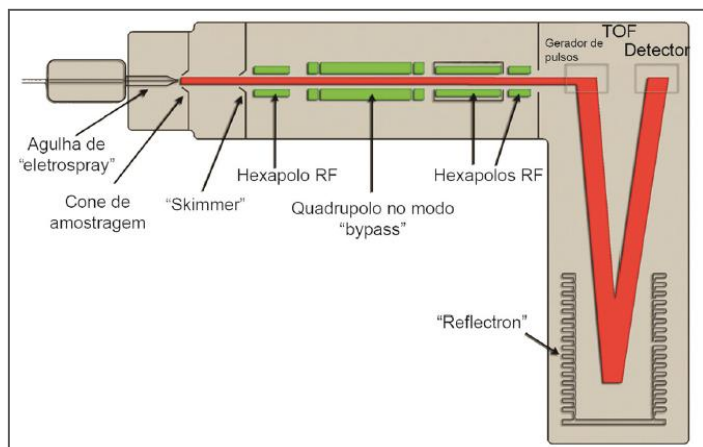
Fonte: Lanças, 2009

O desempenho do oa-ToF pode ser ainda melhorado com a adição de um gás. Esse colide com os íons em um guia de vários polos (usualmente, um quadrupolo ou hexapolo operando apenas com radiofrequência – modo *rf-only*), diminuindo a energia (“resfriando”) dos íons antes de eles entrarem na região de aceleração ortogonal, também denominada *pulser*, resultando na focalização dos íons em um feixe de diâmetro menor. Na região de alto vácuo situada antes do pulser,

um conjunto de lentes eletrostáticas torna o feixe de íons paralelo, minimizando problemas de divergência na direção de aceleração. A combinação desses sistemas – aceleração ortogonal e resfriamento por colisão com gás, juntamente com o *reflectron*, aumentaram a resolução dos atuais ToF-MS sem diminuir sua sensibilidade (Lanças, 2013).

A Fig. 5 ilustra o esquema de um ToF-MS de alta resolução, com aceleração ortogonal e *reflectron*. Os hexapolos e quadrupolos servem de guia para os íons no modo ToF, podendo ser utilizados para uma montagem em tandem (MS-MS) do tipo Q-ToF, empregando dois analisadores (quadrupolo-tempo de voo). Esses equipamentos possuem elevada resolução (no modo linear a resolução é limitada), boa sensibilidade, velocidade de varredura muito rápida (importante para picos cromatográficos estreitos). Porém exigem eletrônica bastante sofisticada, bom controle do tempo, da energia inicial e da distribuição espacial dos íons. Sua aplicação é bastante ampla, especialmente quando alta resolução é necessária. A faixa de massas que analisa é ampla, mas na prática, massas muito elevadas – muito superiores a 500.000 Da – são difíceis de serem determinadas com boa precisão e exatidão (Lanças, 2009).

Figura 5. Analisador do tipo ToF com sistema de aceleração ortogonal (oa) e *reflectron*, podendo operar no modo LC/MS-MS na configuração Q-ToF (quadrupolo -ToF) ou no modo LC-ToF utilizando o quadrupolo apenas como filtro de massa, ao invés de analisador, ou seja, aplicando apenas radiofrequência, Rf (Rf-only mode)

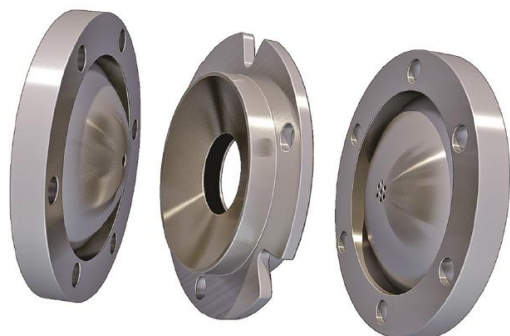


Fonte: Lanças, 2009

3.5.4.2.3. Ion trap

Os analisadores do tipo *ion trap*, também denominados de quadrupolos tridimensionais ou quadrupolos *ion trap*, “capturam” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantêm “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torne os íons de determinada razão m/z instáveis, liberando-os do *trap* (Ardrey, 2003; Hager e Le Blanc, 2003). Nos analisadores do tipo *ion trap* um eletrodo hiperbólico na forma de um anel (denominado *ring electrode*) é colocado entre dois eletrodos hiperbólicos denominados eletrodos *end cap*. Uma voltagem Rf (corrente alternada, AC), de amplitude variável V e com frequência ao redor de 1 MHz, é aplicada ao *ring electrode*, enquanto que os eletrodos *end cap* são aterrados (Fig. 6).

Figura 6. Eletrodos que formam a parte principal de um analisador do tipo ion trap. O eletrodo central é utilizado para aprisionar os íons, enquanto os outros dois servem um para focalizar a entrada dos íons provenientes da fonte de ionização no eletrodo central e o outro para focalizar a saída dos íons em direção ao detector



Fonte: Lanças, 2009

Os dois eletrodos *end cap* apresentam um orifício no centro; o eletrodo superior permite a passagem dos íons provenientes da fonte de ionização (eletrodo de entrada) e os direciona para o *ring electrode*, enquanto que o orifício do eletrodo de saída serve para direcionar os íons ejetados para detecção. Nesse tipo de analisador normalmente não se aplica voltagem DC (corrente direta); apenas a Rf. Tipicamente, o filamento é ligado e os íons dentro do *trap* (armadilha), ali formados ou nele introduzidos – com um valor de m/z acima de um limite estabelecido por V – serão aprisionados (*trapped*) por um tempo ao redor de 1 ms (milissegundo). O filamento é então desligado e uma varredura de V é executada para obter-se um espectro de massas. Os íons de razão massa/carga igual a m/z serão acelerados na direção do eixo z e ejetados pelo eletrodo *end cap* de saída dos íons sendo, então, detectados. As equações que descrevem o movimento dos íons do *ion trap* são similares às descritas para o quadrupolo linear (Lanças, 2013).

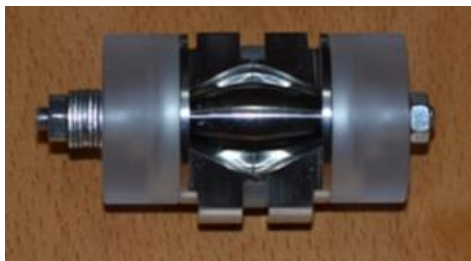
Juntamente com o quadrupolo linear, o *ion trap* é um dos analisadores de íons mais populares no momento devido a seu custo relativamente baixo e pequeno tamanho, podendo ser utilizado na obtenção de analisadores que ocupam pouco espaço. Sua resolução é similar à do quadrupolo linear (unitária), podendo ser aumentada empregando-se varreduras mais lentas em uma faixa de massas menores. Nessas condições, resoluções próximas de 5.000 podem ser obtidas. As aplicações típicas desse analisador são similares àquelas do quadrupolo (Lanças, 2013).

3.5.4.2.4. Orbitrap

O orbitrap é um analisador do tipo *ion trap* que consiste basicamente de três eletrodos, conforme mostrado na Fig. 7. Neste analisador, os íons aprisionados oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga e pode ser determinada e convertida em um espectro de massas, utilizando a transformada de Fourier, com alta precisão (Hu et al., 2005; Walther e Mann, 2010; Zubarev e Makarov, 2013). Devido ao seu desempenho analítico, com amplo intervalo dinâmico da precisão de massas, alta resolução, sensibilidade e estabilidade do sistema, o orbitrap tem inúmeras aplicações, tais como a identificação de compostos em misturas complexas para a análise em níveis traços, em estudos de proteômica, metabolômica, controle de doping e detecção de contaminantes em alimentos e rações. O orbitrap pode ser combinado

de maneira eficaz a vários sistemas de cromatografia líquida e também pode operar com equipamentos individuais com fontes de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), devido à alta resolução oferecida (Picó, 2015).

Figura 7. Analisador do tipo orbitrap



Fonte: adaptado de Zubarev e Makarov (2013)

3.5.5. Espectrometria de massas sequencial

A espectrometria de massas sequencial (MS-MS) emprega duas fases de análise de massas, com o objetivo de avaliar seletivamente a fragmentação de íons particulares em uma mistura de íons. Diferentes tipos e combinações de instrumentos e formas de varredura de íons podem ser utilizados para realização desta técnica de acordo com o tipo e os objetivos da análise (Hoffmann, 1996).

3.5.5.1.1. Triplo quadrupolo

Este instrumento é 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 (DIC), e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

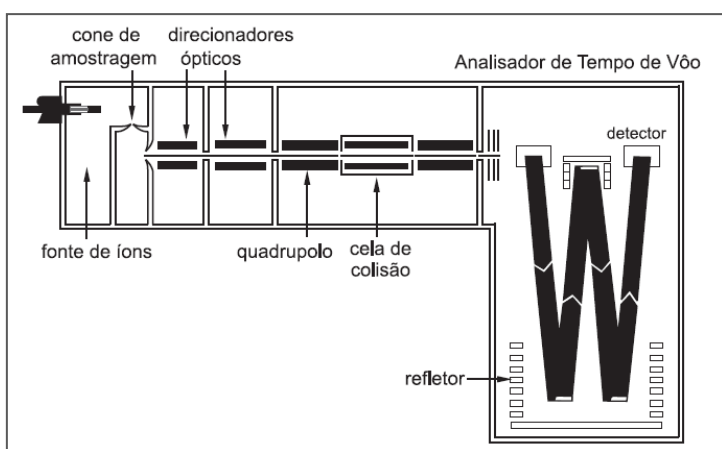
Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N₂), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Quando a DIC é realizada em baixa energia, as reações de fragmentação levam geralmente à perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.), dependendo da natureza do íon precursor. Esta 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 a 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 excessiva. Além de informações estruturais, a DIC pode melhorar a detectabilidade do método quando usada para gerar um íon característico de uma molécula e assim realizar sua detecção a partir deste 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).

3.5.5.1.2. Quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF)

É um instrumento em que o último estágio do triplo quadrupolo é substituído por um ToF disposto ortogonalmente ao segundo quadrupolo (Fig. 8). Este instrumento, ao invés de varrer sequencialmente um intervalo de razões m/z selecionadas e gerar o espectro das massas selecionadas, detecta todos os íons que entram no tubo de voo em um tempo específico, o que só é possível devido à sua alta velocidade de varredura (Chiaradia et al., 2008).

Figura 8. Esquema de um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF)



Fonte: Lanças, 2009

3.5.5.2. Técnicas de varredura

No modo de varredura dos íons produto (*product-ion scan*), considerando-se um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, no primeiro estágio (EM1) é isolado o íon de interesse que, em seguida, é fragmentado na cela de colisão. No segundo estágio do espectrômetro de massas (EM2) é feita a varredura dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon de interesse isolado em EM1 para obtenção do espectro de massas. Esta técnica também pode ser realizada no “*ion-trap*” (Chiaradia et al., 2008).

A varredura do íon precursor (*precursor-ion scan*) é realizada quando o EM1 é ajustado para transmitir íons dentro de um intervalo de m/z de interesse, os quais são fragmentados na cela de colisão, para que em EM2 sejam transmitidos íons de uma única razão m/z (íon produto de fragmentação). O sinal só é gerado no detector quando EM1 e EM2 estão transmitindo, isto é, quando um íon transmitido por EM1 se fragmenta na cela de colisão gerando o íon produto selecionado que atravessa EM2 (Chiaradia et al., 2008).

A varredura da constante perda de fragmentos neutros (*constant-neutral-loss scan*) permite observar íons que se fragmentam perdendo uma massa de estrutura química específica e neutra.

É realizada no triplo quadrupolo varrendo-se todos os estágios da MS-MS simultaneamente para comparar as diferenças entre as massas varridas por eles (Chiaradia et al., 2008).

Na varredura do monitoramento seletivo de reações (*selected-reaction monitoring*) é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no triplo quadrupolo por EM1 aos seus correspondentes íons produtos que atravessam EM2. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este modo de varredura é denominado “monitoramento de reações múltiplas” (*multiple-reaction monitoring*) ou MRM (Chiaradia et al., 2008).

3.6. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em carne de frango

Para garantir a segurança no consumo de produtos de origem animal pela população, agências regulatórias de todo o mundo instituíram normas para o controle da presença de resíduos e contaminantes nos alimentos, estabelecendo LMR de diferentes substâncias e nas mais diversas matrizes, para que os mesmos não provoquem danos à saúde dos consumidores. Desta maneira, as metodologias analíticas utilizadas para a determinação de substâncias tóxicas em alimentos devem ser capazes de quantificar os resíduos em concentrações muito baixas, assim como identificá-los de maneira inequívoca. A técnica de HPLC/MS-MS possibilita a obtenção de informações estruturais acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características do tempo de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, utilizando HPLC/MS-MS é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas.

Devido a essa elevada seletividade, os efeitos da interferência de componentes da matriz sobre o sinal obtido são minimizados, de forma que procedimentos mais simples de preparo das amostras podem ser empregados, eliminando, muitas vezes, a necessidade de realizar várias etapas de purificação da amostra. Isto diminui o custo e o tempo necessários para a realização das análises, de forma que possam ser aplicadas como procedimentos de rotina em laboratórios de controle da qualidade de alimentos. Além disso, a HPLC/MS-MS possibilita a obtenção de menores limites de detecção e quantificação quando comparada à HPLC/MS, devido aos modos de varreduras possíveis de serem realizados, o que pode favorecer sua aplicação à análise de resíduos em níveis traços (Chiaradia et al., 2008).

Shen et al. (2010) validaram uma metodologia por UPLC/MS-MS para pesquisa de quinolonas, tetraciclina e sulfonamidas em músculo de frango. Os autores utilizaram a metodologia validada para a pesquisa de resíduos destes medicamentos em 103 amostras de carne de frango, coletadas diretamente de uma indústria de processamento, na região norte da China. Foram encontradas duas amostras positivas para ciprofloxacina ($18,1 \pm 1,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $22,0 \pm 2,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$), duas amostras positivas para doxiciclina ($7,8 \pm 0,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $5,4 \pm 0,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e uma amostra positiva para enrofloxacinina ($12,4 \pm 0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Cetinkaya et al. (2012), utilizando a técnica LC/MS-MS, realizaram a pesquisa de resíduos de tetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em 60 amostras de carne de frango provenientes do comércio varejista na região de Bursa, na Turquia. Os autores encontraram quatro amostras positivas para doxiciclina, com concentrações variando entre 19,9 a $35,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e uma amostra positiva para tetraciclina, na concentração de $17,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Gibson et al. (2012) avaliaram a presença de resíduos dos antimicrobianos espiramicina, tilosina, virginiamicina e bacitracina, pela técnica LC/MS-MS no músculo do peito de frango de corte, que receberam os medicamentos na ração durante um período de seis dias. Após zero, um, dois, quatro e sete dias de retirada, quatro aves de cada grupo foram eutanasiadas para avaliação da presença de resíduos. Bacitracina e virginiamicina não foram detectadas, indicando um período de retirada zero. As concentrações de espiramicina variaram entre 21,9 e 49,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ no dia zero de retirada, e entre 0,4 e 0,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ após sete dias de retirada da ração contendo os medicamentos. No dia zero de retirada, os níveis de tilosina variaram entre 0,4 e 0,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e nas avaliações subsequentes, as concentrações encontradas ficaram abaixo do limite de detecção do método.

3.7. Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida, garantindo confiabilidade dos resultados. Este processo é necessário quando o método a ser empregado ainda não é reconhecido e aprovado por órgãos reguladores e deve ser realizado sempre que um método existente for modificado para atender a requisitos específicos, ou quando um método totalmente novo for desenvolvido visando assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. Nestes casos, todas as variáveis do método devem ser consideradas, incluindo procedimento de amostragem, preparo da amostra, manipulação dos insumos e equipamentos, análise laboratorial propriamente dita, interpretação e análise dos dados. (Lanças, 2004; Ribani et al., 2007; Souza, 2007; INMETRO, 2011).

De uma maneira geral, pode-se distinguir os procedimentos de validação de métodos analíticos em duas categorias. A primeira é a validação no laboratório, também conhecida como “*in house validation*”, que consiste nas etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente, seja para verificar se um determinado método está sendo bem conduzido. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade interlaboratorial. A segunda é conhecida como validação completa, ou “*full validation*”, e envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade interlaboratorial da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Pode-se considerar a validação no laboratório como sendo uma etapa preliminar à validação completa (Thompson et al., 2002; Ribani et al., 2007).

Na literatura, muitas diretrizes de validação de métodos analíticos que são aceitas por órgãos reguladores estão disponíveis. A Decisão 2002/657/CE fornece as informações gerais sobre os parâmetros de desempenho necessários para a validação de métodos analíticos para a pesquisa de resíduos em produtos de origem animal (EC, 2002). Para a validação do método podem ser utilizadas características de desempenho, tais como linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) (EC, 2002).

3.7.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais à quantidade do analito presente na amostra, em um intervalo especificado (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002). A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e é verificada a partir de uma equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Em geral, são necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas deve ser, no mínimo, de duas a sete em cada nível de concentração (Souza, 2007; INMETRO, 2011). Para as análises em nível de traços, é recomendado adotar o limite de quantificação como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2011).

A equação da reta que relaciona resposta obtida no ensaio em função da concentração do analito é:

$$y = ax \pm b$$

Sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica (sensibilidade).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (Ribani et al., 2007).

3.7.2. Seletividade

A seletividade relaciona-se à capacidade que o método possui em identificar o composto em pesquisa mesmo na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Significa que o valor medido provém somente do analito, assegurando que não há interferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A seletividade pode ser avaliada através de ensaios com padrões ou materiais de referência, análise de amostras com e sem a presença do analito (padrão) ou utilização de outra técnica específica para a substância de interesse que permite comprovar a seletividade (INMETRO, 2011).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Se a seletividade não

for assegurada, alguns parâmetros como linearidade, exatidão e precisão serão seriamente comprometidos (Ribani et al., 2007).

3.7.3. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectada pelo método analítico, mas não necessariamente quantificada (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002). Existem várias maneiras de se determinar o limite de detecção, dentre eles, o método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

O método visual baseia-se na adição de concentrações conhecidas do analito, de modo a distinguir sinal analítico de ruído, pela visualização da menor concentração visível que pode ser confiavelmente detectado. O método da relação sinal-ruído só pode ser aplicado aos procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é realizada comparando sinais medidos a partir de amostras com baixas e conhecidas concentrações do analito com os sinais de amostras em branco. Geralmente, um sinal-ruído entre 3:1 ou 2:1 é considerado aceitável para a estimativa do limite de detecção (Brito et al., 2003; INMETRO, 2011).

A determinação do limite de detecção é feita com base no desvio padrão da resposta e na inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. Assim o limite de detecção pode ser calculado como (Ribani et al., 2004):

$$LD = 3,3 \times s / S$$

Em que:

LD = limite de detecção
s = coeficiente linear da curva analítica
S = inclinação da curva analítica

3.7.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis pelo método analítico (Thompson et al., 2002; EURACHEM, 1998).

A forma de determinação do limite de quantificação é bastante semelhante à utilizada para o limite de detecção e também pode ser feita pelo método visual, método da relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Entretanto, a relação sinal-ruído deve ser de 10:1 e na equação usada para determinação do limite de detecção pelos parâmetros da curva analítica ao invés de utilizar 3,3, a multiplicação é feita por 10 (Ribani et al., 2004), sendo:

$$LQ = 10 \times s / S$$

Em que:

LQ = limite de quantificação
s = coeficiente linear da curva analítica
S = inclinação da curva analítica

Segundo Ribani et al. (2004) o método mais utilizado para estimar o limite de detecção e quantificação é o da relação sinal-ruído, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a medição do ruído não é rotineira e muitas vezes pode ser subjetiva. Além disso, tanto o limite de detecção quanto o limite de quantificação podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em limite de detecção e quantificação mais baixos. O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do limite de detecção e limite de quantificação é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Desse modo, a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao limite de quantificação.

3.7.5. Precisão

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em várias medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e pode ser expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (BRASIL, 2003; Lanças, 2004).

A precisão pode ser avaliada em condições de repetitividade ou reprodutibilidade. A repetitividade é caracterizada pela utilização dos resultados obtidos por análises sucessivas da mesma amostra em curtos intervalos de tempo, usando um mesmo método e efetuadas sob as mesmas condições (laboratório, equipamentos e mesmo analista). Quando os resultados avaliados são obtidos utilizando uma mesma amostra e método, mas em diferentes laboratórios, equipamentos e analistas, essa avaliação da precisão é chamada de reprodutibilidade (Lanças, 2004).

Desse modo, a repetitividade é expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito na amostra, em várias concentrações dentro da faixa de trabalho. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (INMETRO, 2011).

3.7.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao verdadeiro valor contido na amostra, exprimindo a compatibilidade do valor aceito com o valor de referência (Thompson et al., 2002; Lanças, 2004). A exatidão pode ser determinada com o uso de materiais de referência certificados fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo: INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia), NIST (*National Institute of Standards and Technology* - EUA), LGC (*Laboratory of the Government Chemist* - UK). Outras formas de se avaliar a exatidão são através da participação em ensaios interlaboratoriais ou a realização de ensaios de recuperação, em que as amostras são fortificadas com quantidades conhecidas do analito e os resultados são comparados em relação à quantidade real presente na amostra (INMETRO, 2011).

A Tab. 4 apresenta os valores estabelecidos para os parâmetros recuperação (%) e coeficientes de variação de acordo com o proposto por EC (2002) e *Codex Alimentarius* (2009).

Tabela 4. Valores de recuperação e coeficientes de variação considerados aceitáveis para resultados quantitativos

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
≤ 1	50 a 120	35
> 1 a ≤ 10	60 a 120	30
> 10 a ≤ 100	70 a 120	20
> 100 a ≤ 1000	70 a 110	15
> 1000	70 a 110	10

3.7.7. Limite de decisão ($CC\alpha$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro de α . O $CC\alpha$ pode ser calculado a partir dos resultados de análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR utilizando-se a seguinte fórmula (EC, 2002; BRASIL, 2011):

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times S_{\text{reproLMR}}$$

Em que:

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

S_{reproLMR} : é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

3.7.8. Capacidade de detecção ($CC\beta$)

A capacidade de detecção ($CC\beta$) é o teor mais baixo de uma substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro de β . Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontra definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de $1 - \beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1 - \beta$. De forma semelhante ao $CC\alpha$ pode-se calcular o $CC\beta$ a partir da análise de pelo menos 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR, utilizando-se a equação:

$$CC\beta = LMR + 3,28 \times S_{\text{reproLMR}}$$

Em que:

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

S_{reproLMR} : é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa dos resíduos de antimicrobianos foi realizada no músculo do peito e da coxa de frangos de corte, que foram criados 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. A validação do método analítico e as análises dos resíduos dos medicamentos no músculo de frangos de corte foram realizadas no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM), do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG), localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Os antimicrobianos utilizados de forma terapêutica foram a enrofloxacina, a sulfaquinoxalina e a oxitetraciclina.

4.1. Reagentes e padrões

Os padrões dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, com pureza mínima de 98%, foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e apresentavam certificado declarando pureza e validade.

Foram utilizados também ácido tricloroacético (TCA) da marca J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA), ácido heptafluorobutírico (HFBA), da marca Fluka (St. Louis, MO, EUA) e acetonitrila (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes utilizados foram de grau puro para análise (P.A.), exceto os solventes utilizados na cromatografia, que foram de grau LC/MS.

4.2. Preparo dos reagentes e padrões

As soluções padrões de antibióticos foram preparadas a partir da pesagem dos padrões de referência de cada analito, ajustando a massa de acordo com a pureza e a base livre declarada no certificado que acompanhava os padrões. Foram preparadas, inicialmente, em balões volumétricos calibrados de 50 mL, soluções estoque dos antimicrobianos enrofloxacina (125 µg/mL), ciprofloxacina (125 µg/mL), sulfaquinoxalina (250 µg/mL) e oxitetraciclina (200 µg/mL). As soluções de adição dos antimicrobianos, que apresentaram concentração final de 0,5 µg/mL, foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque em água. Alíquotas das soluções estoque de cada antimicrobiano foram adicionadas a um balão volumétrico calibrado, de 50 mL, e o volume final foi completado com água ultrapura.

Para o processo de extração por TCA, foi utilizada uma solução de TCA a 5%, preparada a partir da dissolução de 50g de TCA em um litro de água ultrapura. A solução de HFBA 0,2%, preparada em água ultrapura, foi utilizada como fase móvel A e, como fase móvel B, foi utilizada acetonitrila.

4.3. Validação do método analítico por UPLC/MS-MS para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte

4.3.1. Preparo das amostras

Amostras de músculo do peito e da coxa de frangos de corte, provenientes da FEPEB e que não receberam medicamentos na ração, foram utilizadas como amostras brancas para os procedimentos de validação. Inicialmente, foi realizado um *pool* de amostras do músculo do peito e da coxa, que foram micro processadas e, em seguida, pesados $2,0 \pm 0,05$ g de amostra em tubos de polipropileno de 50 mL utilizando uma balança analítica. Os tubos foram mantidos congelados, em temperatura inferior a -20°C até o momento das análises.

Para o procedimento de extração, os tubos de polipropileno contendo as amostras brancas foram descongelados e as amostras foram fortificadas com os padrões de antimicrobianos nas

concentrações desejadas para cada parâmetro, de acordo com as etapas do procedimento de validação, e agitadas em vortex, permanecendo em repouso por dez minutos. Em seguida, foram adicionados 8 mL da solução de TCA 5%, os tubos foram sonicados em banho de ultrassom por dez minutos e agitados em agitador horizontal por dez minutos. Após esta etapa, uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para microtubos de centrifuga, que foram ultracentrifugados a 14462 xg, a 4°C por 12 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de unidade filtrante com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,22 µm x 13 mm (FilterPro®) em um *vial*, e 10 µL do extrato foram injetados e analisados pelo sistema UPLC/MS-MS.

4.3.2. Parâmetros instrumentais

Para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos no músculo coxa de frangos de corte, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (Prominence UFLC Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo 4000 QTRAP® (AB Sciex, Framingham, MA, EUA) equipado com interface ESI, operado no modo positivo.

Foi utilizada uma coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6 x 50 mm, 1,8 µm) para a separação cromatográfica. A temperatura da coluna foi fixada em 35°C. Os parâmetros da fonte de ionização foram: voltagem do capilar a 5,5 kV e temperatura da fonte de 650°C. Foram utilizadas as fases móveis A (HFBA 0,2%) e B (acetonitrila), em um fluxo de 0,6 mL min⁻¹, conforme o gradiente descrito na Tab. 5. O volume de injeção foi de 10 µL.

Tabela 5. Gradientes das fases móveis em função do tempo de corrida

Tempo de corrida (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,01	90	10
3,00	50	50
3,50	50	50
4,00	90	10
6,00	90	10

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

Para cada analito foram monitoradas duas transições *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), com *Scheduled*, com janela de detecção de 90 segundos. A primeira transição foi utilizada para a identificação e a segunda para confirmação. O potencial de entrada (EP) foi de 10 volts. Nitrogênio foi usado como gás de colisão (CAD) e de dessolvatação (CUR) às pressões de 8,0 e 20,0 psi, respectivamente. Ar sintético ultrapuro foi empregado como gás nebulizante (GS1) e como gás secante aquecido (GS2) à pressão de 50 psi.

Os fragmentos monitorados no modo MRM para o íon precursor e íons produto, o potencial de desagregação (DP), a energia de colisão (CE), o potencial de saída da célula de colisão (CXP) e o tempo de retenção para cada transição estão apresentados na Tab. 6.

Tabela 6. Transições MRM e condições do espectrômetro de massas utilizadas para cada analito

Analitos	DP (V)	Íon precursor (m/z)	CE (eV)	Íons produto (m/z)	CXP (V)	TR (min)
Enrofloxacina	72	360,0	30	342,0	12	3,26
			50	286,0	12	
Ciprofloxacina	61	332,0	30	314,0	12	3,08
			47	231,0	12	
Oxitetraciclina	41	461,3	59	201,1	12	3,13
			53	283,2	12	
Sulfaquinoxalina	50	301,0	23	156,0	12	3,56
			40	108,0	12	

DP: potencial de desagregação; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da célula de colisão; TR: tempo de retenção; V: volts; m/z: razão massa/carga; min: minutos.

4.3.3. Procedimentos de validação

O método analítico por UPLC/MS-MS foi validado de acordo com os seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, CC α e CC β (EC, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2011; INMETRO, 2011).

4.3.3.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade, foram analisadas amostras brancas de músculo do peito de frangos de corte fortificadas com as soluções padrões dos antimicrobianos nas concentrações de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondentes aos valores de 0,05; 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 LMR que foram estabelecidos pelo Regulamento nº 37/2010 da Comissão Europeia para os analitos estudados, em cinco repetições. Após as análises, foi construído um gráfico relacionando área do pico versus concentração e, por regressão linear, foram definidas as equações das curvas e os coeficientes de correlação e determinação (INMETRO, 2011).

4.3.3.2. Seletividade

A seletividade foi avaliada visualmente pela verificação da presença ou não de picos de compostos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

4.3.3.3. Precisão

A precisão das análises foi avaliada pela determinação do coeficiente de variação (CV) em condições de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial. Para a avaliação da repetitividade foram realizadas análises sucessivas da mesma amostra, em curtos intervalos de tempo e efetuadas sob as mesmas condições (equipamentos e mesmo analista). Desse modo, as amostras de músculo de frango foram adicionadas de solução padrão de antimicrobianos para realização de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (0,5 LMR ou 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), média (1,0 LMR ou 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e alta (1,5 LMR ou 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$), com três réplicas cada (ICH, 2005; BRASIL, 2003). No estudo da reprodutibilidade intralaboratorial, foram realizadas as mesmas análises, utilizando, porém, um segundo analista, totalizando 18 determinações.

Os coeficientes de variação foram avaliados de acordo com parâmetros estabelecidos pela Decisão 2002/657/EC e *Codex Alimentarius*, seguindo os valores descritos na Tab. 4 (EC, 2002; CODEX, 2009).

4.3.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, nos quais amostras de músculo de frango foram fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos e os resultados foram comparados em relação às quantidades reais presentes na amostra. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (0,5 LMR ou 50 µg kg⁻¹), média (1,0 LMR ou 100 µg kg⁻¹) e alta (1,5 LMR ou 150 µg kg⁻¹). A recuperação obtida em cada concentração foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \times 100$$

Sendo:

C₁= Concentração do analito na amostra fortificada

C₂= Concentração do analito adicionada à amostra fortificada

4.3.3.5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir da equação que leva em consideração os parâmetros da curva analítica segundo Ribani et al., (2004).

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times s}{S} \qquad \text{LQ} = \frac{10 \times s}{S}$$

Sendo:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

s = coeficiente linear da curva analítica

S = coeficiente angular da curva analítica

4.3.3.6. Limite de decisão (CC_α)

O limite de decisão (CC_α) foi calculado a partir dos resultados de análise 20 amostras brancas fortificadas na concentração do LMR utilizando-se a seguinte fórmula (EC, 2002; BRASIL, 2011):

$$\text{CC}_\alpha = \text{LMR} + 1,64 \times S_{\text{reproLMR}}$$

Em que:

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

S_{reproLMR}: é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

4.3.3.7. Capacidade de detecção (CCβ)

A capacidade de detecção (CCβ) foi calculada a partir da análise 20 matrizes brancas fortificadas na concentração do LMR, utilizando-se a equação:

$$CC\beta = LMR + 3,28 \times S_{reproLMR}$$

Em que:

LMR: é a concentração do LMR nas mesmas unidades de concentração do resultado final.

$S_{reproLMR}$: é o desvio-padrão amostral das concentrações determinadas na série de 20 análises no nível de concentração do LMR, em condições de reprodutibilidade intralaboratorial

4.4. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte

4.4.1. Criação das aves

Os frangos de corte foram alojados em um galpão experimental convencional e distribuídos em oito boxes de estrutura metálica com 3 m² cada. Foram utilizados 320 pintos de corte da linhagem Cobb, de um dia de idade. Em cada boxe foram alojados 40 animais (13 aves/m²). O período de criação foi de um a 46 dias de idade. Foram utilizados três tipos de rações de acordo com a fase de criação: inicial, de um a 21 dias de idade; crescimento, de 22 a 35 dias de idade; e acabamento, de 36 a 46 dias de idade. Água e ração foram oferecidos à vontade durante todo o período de criação. As rações dentro de cada fase de criação foram isoproteicas e isoenergéticas, e a composição das mesmas com seus respectivos níveis nutricionais calculados se encontram no Quadro 1.

Quadro 1. Composição das rações e níveis nutricionais calculados

Matérias-primas ou ingredientes (kg)	Rações		
	Inicial	Crescimento	Final
Milho	593,75	652,00	686,00
Óleo de soja	18,75	32,00	30,00
Farelo de soja (45% PB)	318,75	256,00	232,00
Farinha carne e ossos (40% PB)	53,12	44,00	40,00
Sal comum	3,37	3,40	3,40
Calcário	5,75	4,14	2,90
Suplemento Vitamínico	0,50	0,50	0,50
Suplemento Mineral	0,50	0,50	0,50
DL-Metionina	3,12	2,40	2,20
L-Lisina	1,87	1,20	1,30
L-Treonina	0,50	0,26	0,20
Anticoccidiano*	0,55	0,55	0,55
Total	1000	1000	1000
Níveis nutricionais	Rações		
	Inicial	Crescimento	Final
Proteína Bruta - PB (%)	21,970	18,954	18,026
Energia Metabolizável Aparente - EMA (Kcal/Kg)	2,990	3,148	3,184
Cálcio (%)	1,030	0,832	0,726
Fósforo disponível (%)	0,450	0,384	0,357
Metionina digestível	0,600	0,358	0,465
Metionina + Cistina digestível	0,880	0,607	0,705
Lisina digestível	1,180	0,957	0,902

*Salinomicina

4.4.2. Tratamentos

Os tratamentos, definidos de acordo com o antimicrobiano oferecido as aves, foram os seguintes:

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

As dosagens dos antimicrobianos usados foram calculadas com base nas indicações do fabricante, e resultaram nas concentrações de 10 mg kg⁻¹ de peso vivo dos antimicrobianos enrofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, aplicados na água de beber, do 32º até o 34º dia de criação (tratamentos B, C e D). As aves do tratamento A (controle) receberam água sem medicamentos, durante todo o período de criação.

4.4.3. Avaliação de resíduos de medicamentos veterinários

Para a avaliação da presença de resíduos de medicamentos no músculo de frangos de corte, foram utilizadas seis repetições por dia de coleta e por tratamento. As aves dos tratamentos B, C e D foram abatidas nos dias 32 (as aves utilizadas para o abate foram retiradas antes do início do tratamento), 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44 e 46 para coleta de amostras dos músculos do peito e da coxa, que foram analisadas quanto à presença de resíduos. As aves do tratamento A (controle) foram abatidas nos dias 35, 36, 38, 40, 42, 44 e 46 para a coleta das amostras. As amostras colhidas foram congeladas e enviadas ao LRM do LANAGRO/MG para análise de resíduos pela metodologia previamente validada.

Todos os procedimentos de manejo e criação das aves, assim como a etapa de abate dos animais, foram realizados de acordo com os Princípios de Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG e aprovados sob o protocolo nº 93/2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação do método analítico por UPLC/MS-MS para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte

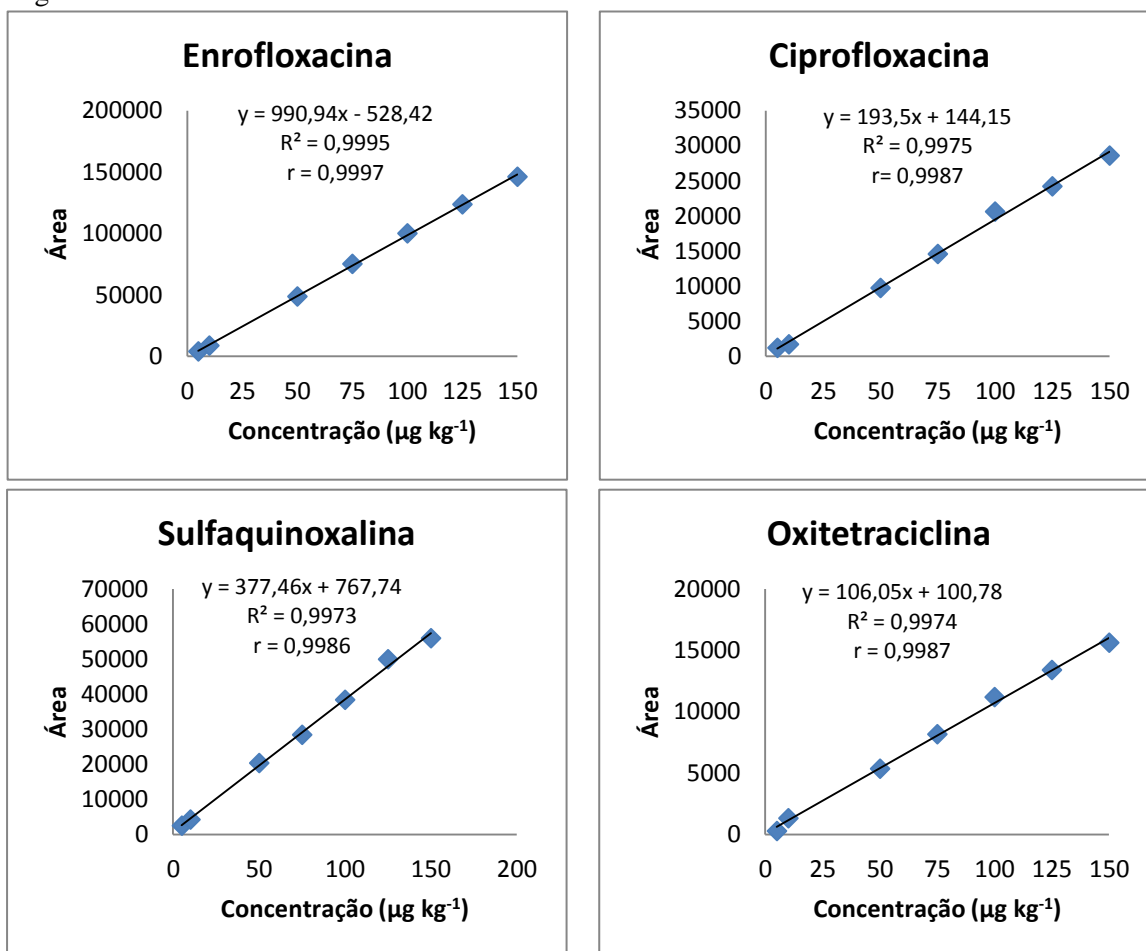
5.1.1. Linearidade

As curvas de calibração, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R²) das análises de matriz branca fortificada, obtidas na avaliação da linearidade, estão representadas na Fig. 9.

De acordo com os resultados observados, pôde-se concluir que o modelo foi adequado, pois o coeficiente de determinação (R²) foi superior a 0,99, indicando um excelente ajuste dos dados para a linha de regressão.

Os valores dos coeficientes de correlação (r) também foram superiores a 0,99, estando em conformidade com os critérios da ANVISA que recomenda um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003). Os valores encontrados também estão de acordo com o INMETRO (2011) que recomenda valores maiores que 0,90 para os testes de linearidade. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2007).

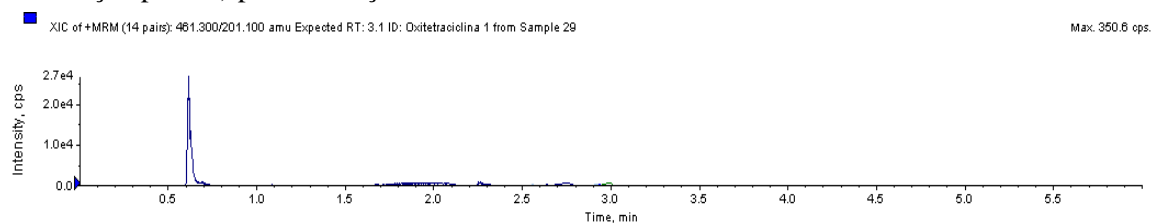
Figura 9. Curvas de linearidade dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, adicionados ao músculo de frango, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$



5.1.2. Seletividade

O cromatograma da Fig. 10 demonstra a análise de uma amostra branca (sem adição de padrão) de músculo de frango de corte. A partir da análise de amostras de matriz branca não foi observada a presença de interferentes do método de extração eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 10. Cromatograma da análise de matriz branca (músculo de frango de corte sem adição de solução padrão) para avaliação da seletividade



Na Fig. 11 é possível observar o cromatograma de uma amostra de músculo fortificada com a solução padrão dos antimicrobianos, na concentração de $150 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto na Fig. 12 estão representadas as transições dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina, monitoradas no presente trabalho. Os tempos de retenção para os antimicrobianos estudados foram de 3,26 min para enrofloxacina; 3,08 min para ciprofloxacina; 3,13 min para oxitetraciclina e 3,56 min para sulfaquinoxalina.

Foram realizadas também análises de padrão direto, ou seja, da solução padrão dos antimicrobianos adicionada à água ultrapura (Fig. 13). As transições dos antimicrobianos monitoradas (Fig. 14) apresentaram tempo de retenção semelhante, tanto nas análises de matriz branca fortificada, quanto nas análises de padrão direto.

Figura 11. Solução padrão dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina adicionada à matriz músculo de frangos de corte

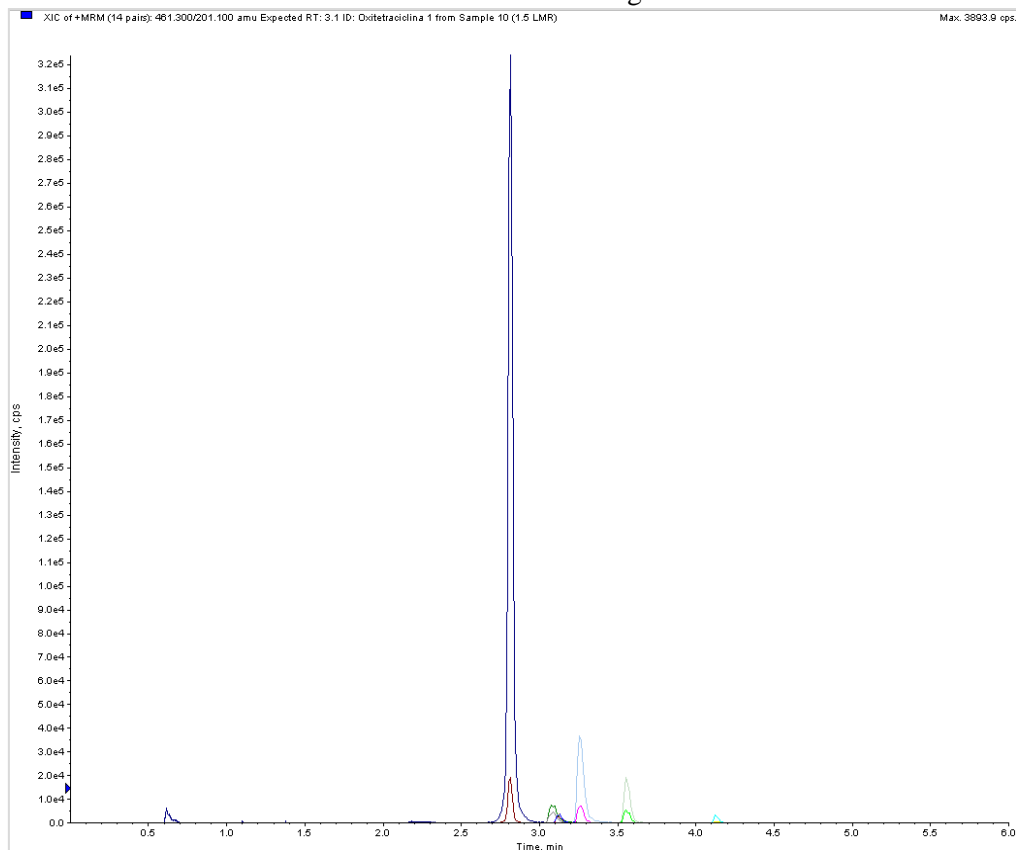


Figura 12. Transições dos antimicrobianos enrofloxacin (A), ciprofloxacina (B), sulfaquinoxalina (C) e oxitetraciclina (D) monitoradas na matriz músculo de frangos de corte

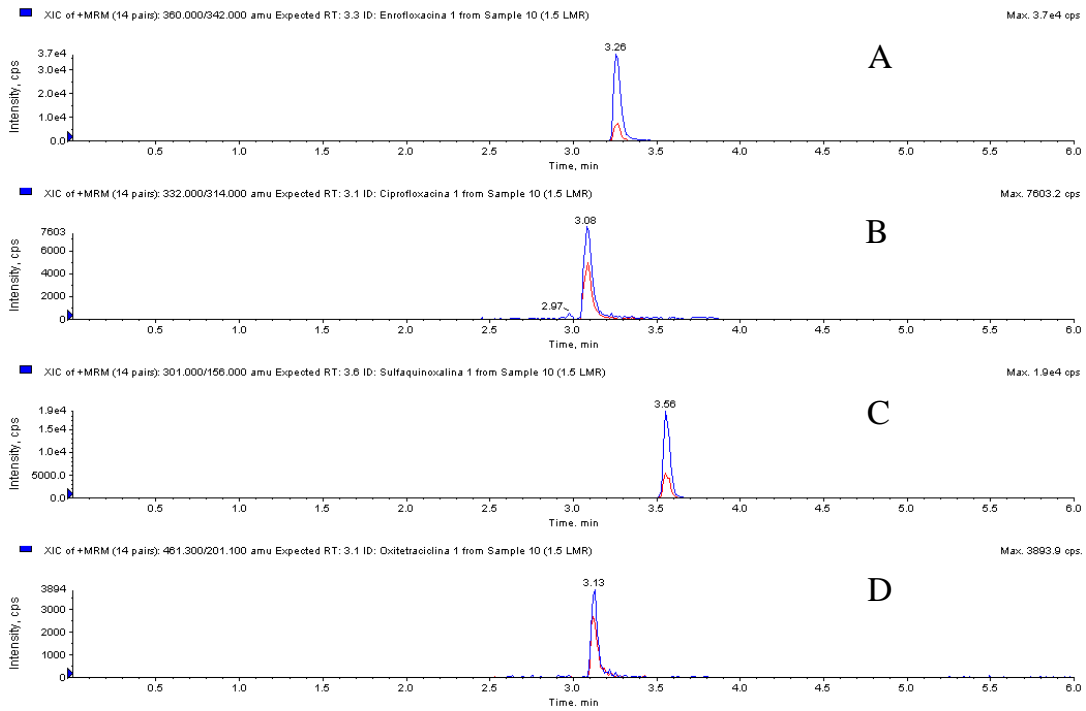


Figura 13. Solução padrão dos antimicrobianos enrofloxacin, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina adicionada à água

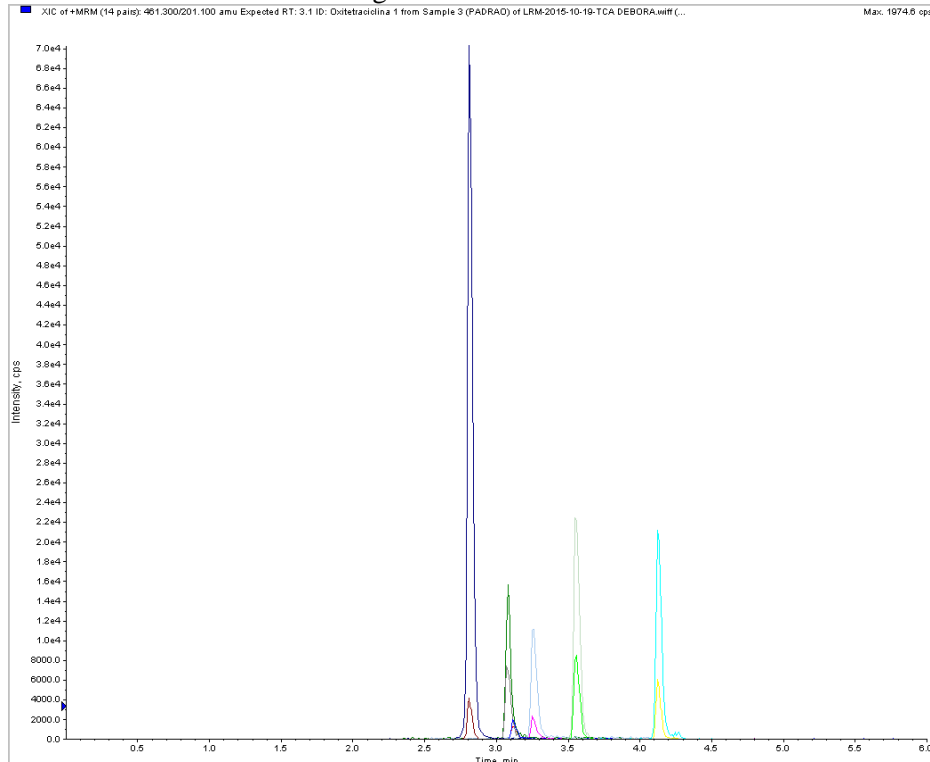
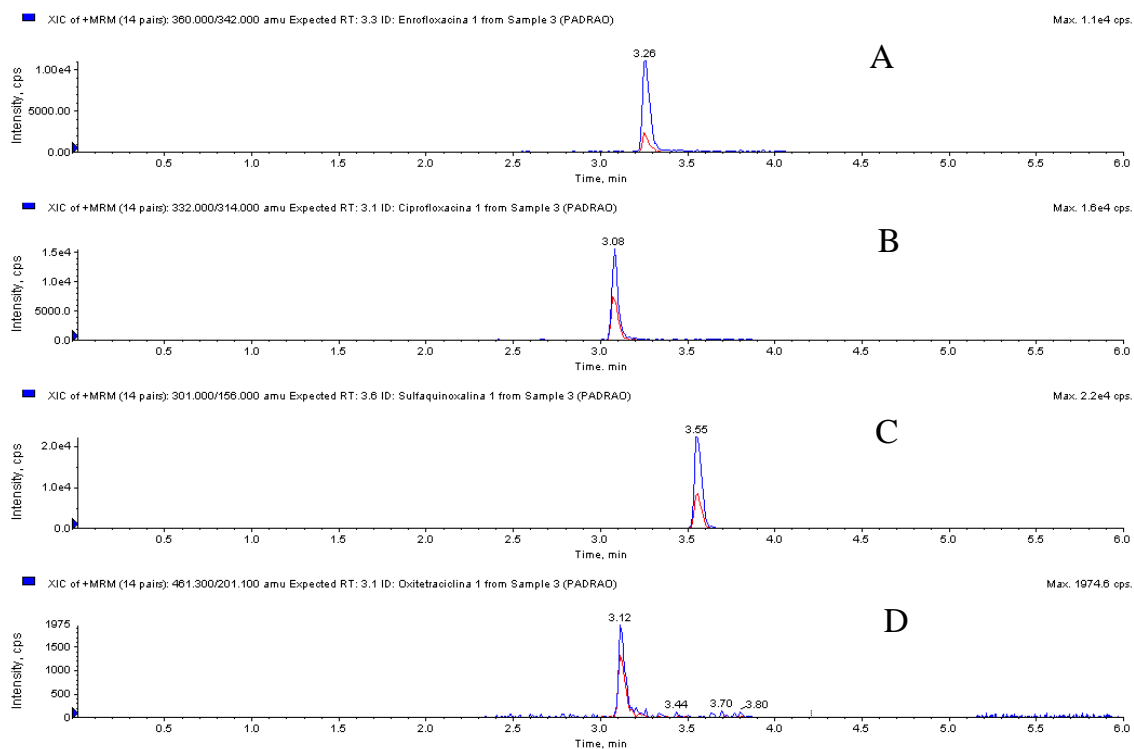


Figura 14. Transições dos antimicrobianos enrofloxacina (A), ciprofloxacina (B), sulfaquinoxalina (C) e oxitetraciclina (D) monitoradas na análise do padrão direto



5.1.3. Precisão

A precisão do método, avaliada por meio de estudos de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, apresentou resultados satisfatórios para todos os analitos estudados, na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tab. 7).

Os coeficientes de variação (CV) dos resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade variaram de 1,46 a 18,44%. Esses valores estão de acordo com o preconizado pela EC (2002) que recomenda um CV máximo de 20%, para a faixa de concentração entre 5 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e um CV máximo de 15%, para a concentração entre 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial, os valores encontrados variaram entre 3,97 e 16,27%. Segundo o *Codex Alimentarius*, nos estudos de reprodutibilidade intralaboratorial, os CV máximos recomendados são de 32%, 22% e 18% para as faixas de concentração entre 1 a 10, 10 a 100 e 100 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (CODEX, 2009).

Tabela 7. Coeficientes de variação obtidos sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliação da precisão do método

Analito	Repetibilidade – CV (%)			Reprodutibilidade – CV (%)		
	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	150 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Enrofloxacina	18,44	14,16	13,52	13,52	11,39	12,13
Ciprofloxacina	8,10	1,46	4,43	9,41	8,18	3,98
Sulfaquinoxalina	3,30	7,76	5,85	16,27	8,16	3,97
Oxitetraciclina	17,79	6,05	5,37	14,30	8,01	4,80

5.1.4. Exatidão

Na Tab. 8 estão indicados os percentuais médios de recuperação obtidos na avaliação da exatidão do método para a pesquisa de antimicrobianos em músculo de frango. O percentual de recuperação dos antimicrobianos no músculo de frango variou entre 88,87% e 104,90% na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a recuperação variou de 94,26% a 108,30%. Na concentração de 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a menor taxa de recuperação foi observada de 91,93% e a maior de 108,03%.

Tabela 8. Recuperações médias dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina na matriz músculo de frangos de corte

Analito	Recuperação (%)			Médias
	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	150 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Enrofloxacina	97,31	98,89	95,89	97,36
Ciprofloxacina	104,90	108,30	108,03	107,08
Sulfaquinoxalina	100,23	106,28	102,64	103,05
Oxitetraciclina	88,87	94,26	91,93	86,40

A exatidão, avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação, é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo e este erro ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas, substâncias interferentes na amostra, entre outros (Brito et al., 2003). Desse modo, existe uma faixa de variação aceitável, na qual os resultados dos ensaios recuperação devem se enquadrar. O *Codex Alimentarius* recomenda valores de recuperação entre 70 a 120% e de 70 a 110% para concentrações do analito entre 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (CODEX, 2009).

A oxitetraciclina apresentou os menores valores de recuperação dentre os analitos estudados, o que pode ser justificado devido ao efeito quelante exercido por alguns cátions bivalentes, tais como o cálcio e o magnésio presentes na amostra. No entanto, os valores de recuperação encontrados para este e para os demais analitos estudados indicaram que a exatidão da metodologia para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte está de acordo com o preconizado pelo *Codex Alimentarius* na faixa de 5 a 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (CODEX, 2009).

5.1.5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método de todos os antimicrobianos avaliados estão apresentados na Tab. 9. Os valores obtidos para cada parâmetro foram calculados com base nas equações apresentadas no item 4.3.3.5.

Tabela 9. Limites de detecção e de quantificação do método UPLC-MS/MS para os antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina na matriz músculo de frangos de corte

Analito	Limite de detecção ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Enrofloxacina	1,76	5,33
Ciprofloxacina	2,46	7,45
Sulfaquinoxalina	6,71	20,34
Oxitetraciclina	3,12	9,46

Apesar de estarem disponíveis diferentes formas para cálculo do LD e LQ, como o método visual e da relação sinal ruído, a avaliação destes parâmetros, baseada nos parâmetros da curva analítica, é estatisticamente mais confiável, e a curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ (Ribani et al., 2004).

5.1.6. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$)

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$, calculados a partir do desvio padrão de 20 amostras brancas fortificadas no nível no LMR, estão descritos na Tab. 10.

Tabela 10. Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) do método UPLC-MS/MS para os antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina na matriz músculo de frangos de corte

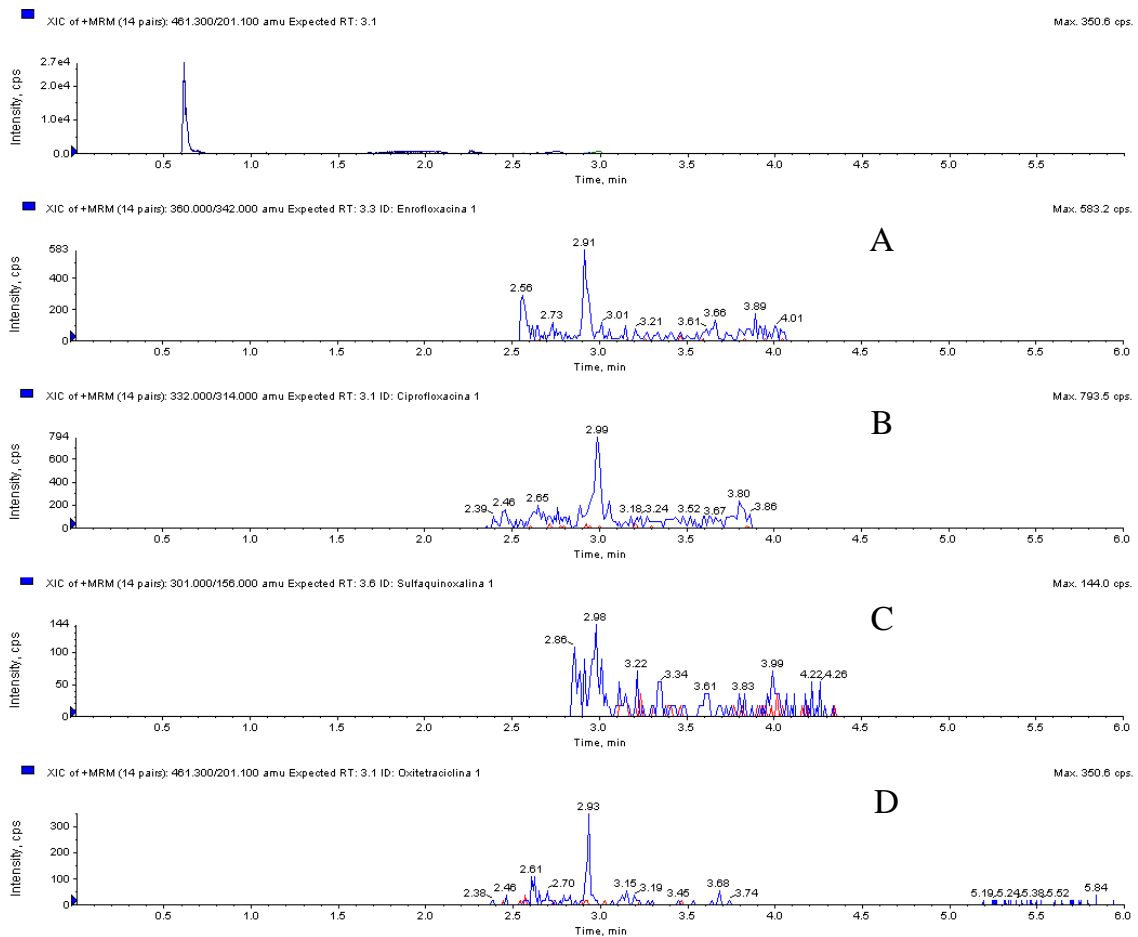
Analito	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Enrofloxacina	111,70	123,40
Ciprofloxacina	120,86	141,72
Sulfaquinoxalina	111,34	122,67
Oxitetraciclina	113,22	126,43

O cálculo destes parâmetros é recomendado pela Decisão 2002/657/CE. O $CC\alpha$ é a concentração acima da qual se pode decidir, com uma certeza estatística de $1-\alpha$, que o limite permitido foi realmente excedido. Assim, de acordo com a Comissão Europeia, o resultado de uma análise deve ser considerado não conforme caso o $CC\alpha$ do método de confirmação da substância analisada seja excedido. Desta maneira, no caso de substâncias que possuem um LMR estabelecido, a capacidade de detecção indica a concentração na qual o método apresenta o risco de 5% de tomar uma falsa decisão conforme. (EC, 2002).

5.2. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte

Os resultados das análises da pesquisa de resíduos de antimicrobianos no músculo de frangos demonstraram que, nas amostras do grupo controle, não foram detectados resíduos de nenhum dos medicamentos utilizados no tratamento das aves, indicando que não houve contaminação durante etapas de fabricação da ração, de diluição dos medicamentos na água de beber ou de tratamento das aves. A partir das análises dos cromatogramas gerados não foram detectados picos cromatográficos nos tempos de retenção correspondentes às duas transições monitoradas (Fig. 15). O método de UPLC-MS/MS validado foi considerado um método confirmatório para a pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários, por avaliar, além do tempo de retenção dos analitos de interesse, a razão 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, o que não foi observado nos cromatogramas avaliados no grupo controle.

Figura 15. Cromatogramas da pesquisa de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacin (A), ciprofloxacina (B), sulfaquinoxalina (C) e oxitetraciclina (D) em amostra de músculo de frango de corte do grupo controle



5.2.1. Enrofloxacin

No grupo de animais tratados com enrofloxacin, as maiores concentrações ($P < 0,05$) de resíduos deste medicamento e de seu metabólito, ciprofloxacina, foram detectadas durante os dias de tratamento e até dois dias após o término deste (Tab. 11).

A Fig. 16 exemplifica o resultado da análise de uma amostra do grupo de animais tratados com este medicamento, coletada no 33º dia de criação. Foram observados picos cromatográficos com alta intensidade de sinal para os analitos enrofloxacin e ciprofloxacina.

Tabela 11. Resultados das concentrações médias de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacin e ciprofloxacina analisados pelo método validado de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual

Dia de tratamento	Enrofloxacin ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Ciprofloxacina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
32	ND a	ND a
33	2941,763 b	241,702 b
34	2994,004 b	273,462 b
35	2551,823 b	358,840 b
36	484,127 b	44,570 b
38	<LQ a	<LQ a
40	6,227a	ND a
42	<LQ a	ND a
44	6,789 a	ND a
46	<LQ a	ND a

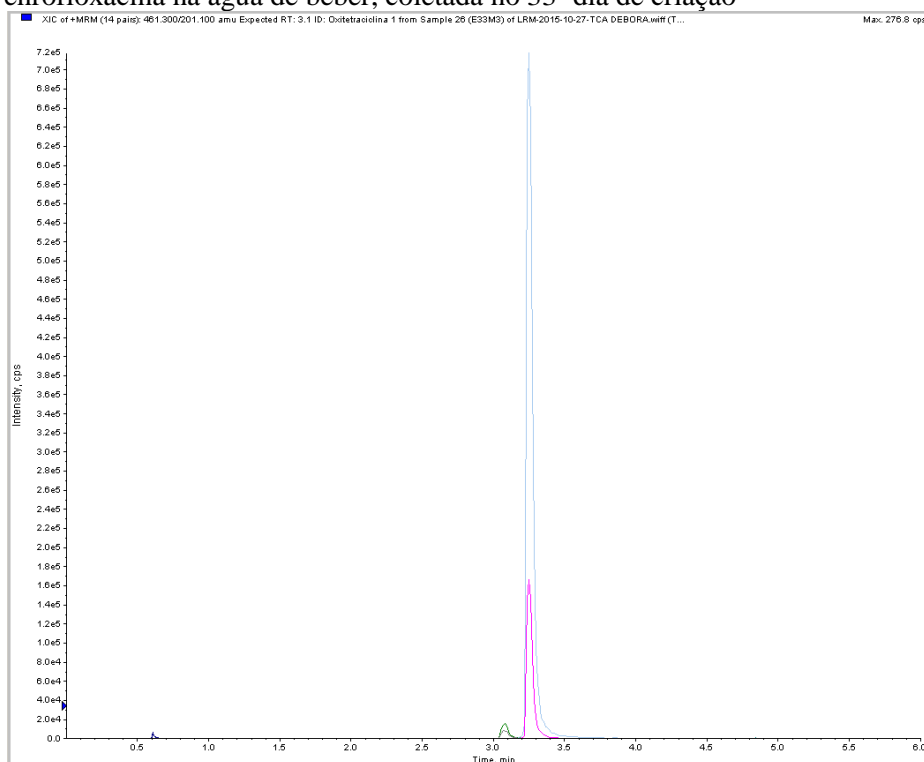
Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

LQ: limite de quantificação = $5,33 \mu\text{g kg}^{-1}$ (enrofloxacin) e $7,45 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ciprofloxacina)

ND: $< 1,76 \mu\text{g kg}^{-1}$ (enrofloxacin) e $< 2,46 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ciprofloxacina)

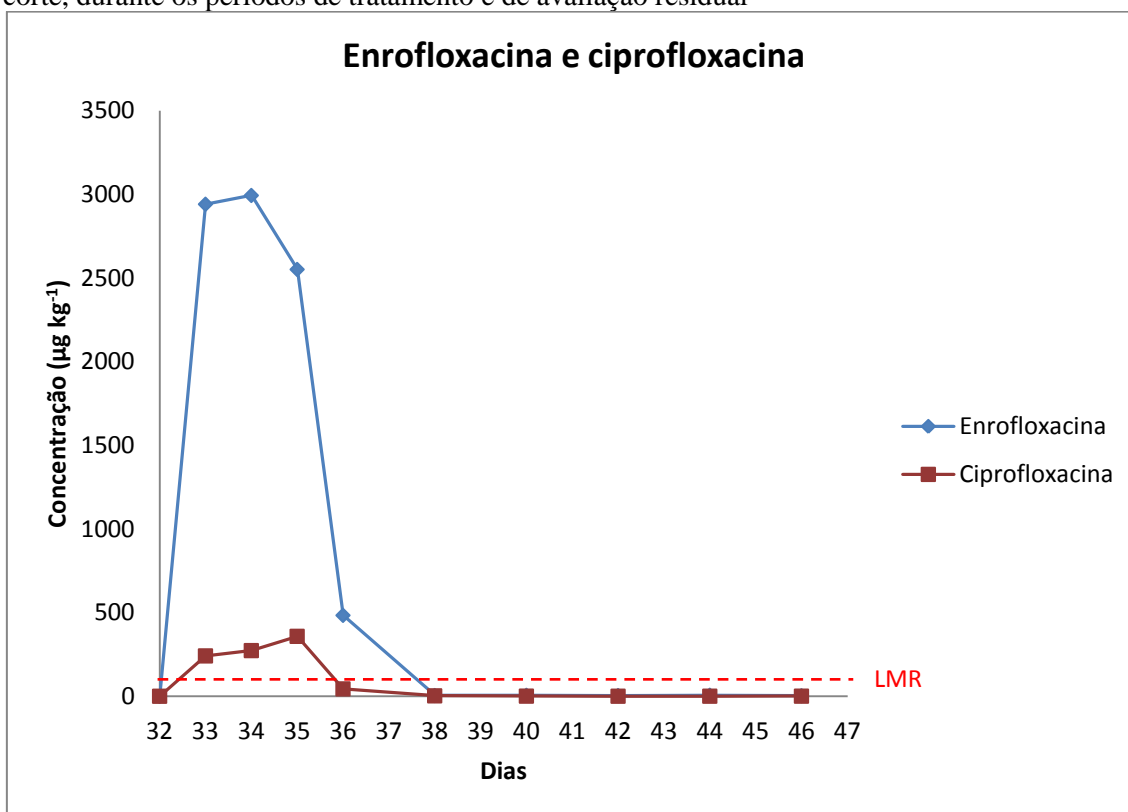
Após o início da administração do medicamento via água de beber, no 33º dia de criação das aves, foi observada alta concentração de resíduos de enrofloxacin na musculatura de frangos de corte. O tratamento das aves foi interrompido no dia 34 de criação e as concentrações declinaram rapidamente. O comportamento da ciprofloxacina foi semelhante, porém, no 35º dia de criação, enquanto houve uma redução na concentração de enrofloxacin foi observado um aumento, porém não significativo, no teor de ciprofloxacina, o que pode ser explicado devido ao fato de a ciprofloxacina ser um produto da metabolização da enrofloxacin (Fig. 17).

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



A enrofloxacin é um antimicrobiano sintético da classe das fluorquinolonas, de emprego exclusivo na medicina veterinária, sendo considerada eficaz e segura em terapias combinadas com outros medicamentos (Garcia-Ovando et al., 1999; Papich e Riviere, 2001). Após a administração, este composto é metabolizado e perde um grupo etila *in vivo* formando a ciprofloxacina. A enrofloxacin é estruturalmente semelhante a seu metabólito, a ciprofloxacina, porém a farmacocinética da ciprofloxacina é diferente e sua biodisponibilidade é menor no organismo da ave quando comparada à enrofloxacin (Ito et al., 2005). Apesar de a enrofloxacin ser utilizada apenas em medicina veterinária, é importante destacar que a ciprofloxacina é um antimicrobiano farmacologicamente ativo que, além de ser utilizado em medicina veterinária, é também empregado na medicina humana (Garcia-Ovando et al., 1999).

Figura 17. Concentrações médias de resíduos dos antimicrobianos enrofloxacin e ciprofloxacina analisados pelo método de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual



De acordo com Palermo-Neto et al. (2011), após a administração das fluorquinolonas observa-se rápida absorção pelo trato gastrointestinal e, dependendo da espécie animal, a biodisponibilidade pode variar de 30 a 90% de princípio ativo. Segundo estes autores, estes fármacos acumulam-se pouco nos tecidos, justificando o curto período de retirada para o abate dos frangos de corte.

Devido seu amplo espectro de ação, a enrofloxacin é utilizada na avicultura para o tratamento de infecções por *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, coriza infecciosa das galinhas, infecções por *Ornithobacterium rhinotracheale*, celulite por Gram-negativos, estafilococose, salmoneloses, dentre outras infecções (Ito et al., 2005). Ao avaliar os resultados do subprograma de monitoramento do PNCRC de 2014, das 54 amostras de músculo de ave analisadas para a

pesquisa de quinolonas foi encontrada uma (1,85%) amostra positiva para a enrofloxacin, na concentrao de 635,34 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2015b). Este fármaco é amplamente utilizado na avicultura comercial e podem ocorrer falhas de manejo, tais como dosagem inadequada ou o não cumprimento do período de retirada.

O uso de enrofloxacin para animais de produoao é proibido nos Estados Unidos (Goetting et al., 2011) e, na União Europeia sua aplicaao não é indicada para poedeiras (EC, 2009). O FDA suspendeu a aprovaao de uso da enrofloxacin em frangos de corte no ano de 2005, com a justificativa de que a utilizaao de fluorquinolonas nas aves pode levar ao desenvolvimento de *Campylobacter* spp. resistentes a estes antimicrobianos e, conseqüentemente, ao aumento do número de infecoes por estes micro-organismos resistentes em seres humanos (FDA, 2015; Landoni e Albarellos, 2015).

A Comunidade Europeia, por meio do Regulamento não 37/2010 (EC, 2009) e o Brasil, através do PNCRC (BRASIL, 2015a) estabeleceram o LMR de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o somatório das concentraoes de enrofloxacin e ciprofloxacina na matriz músculo de ave. Caso as avaliaoes fossem realizadas para cada medicamento separadamente, considerando o LMR de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, no 36o dia de criaao das aves, a concentraao média de ciprofloxacina (44,57 $\mu\text{g kg}^{-1}$) seria inferior ao LMR e as amostras seriam consideradas conformes (Fig. 16). No entanto, ao se realizar o somatório das concentraoes dos resíduos de enrofloxacin e ciprofloxacina, o teor médio observado, foi de 528,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, superior ao LMR.

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

Heitzman (1997) avaliou, utilizando enrofloxacin radiomarcada, o tempo de depleao da droga em frangos de corte e encontrou as concentraoes de 748 \pm 178, 52 \pm 16, 11 \pm 3 e 3 \pm 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no músculo, após seis horas, 24 horas, três dias e sete dias, respectivamente.

O estudo e a definiao do correto período de retirada dos antimicrobianos utilizados para tratamento dos frangos de corte tem impacto economico e também na adequaao do manejo, principalmente nas fases finais de criaao. O estabelecimento de períodos de retirada, baseado em estudos científicos de depleao das drogas e na segurança da utilizaao desses medicamentos, possibilita o tratamento adequado dos animais e o envio para o abate de lotes tratados que obedecem o período necessário para a eliminaao do medicamento e de seus resíduos do organismo do animal.

5.2.2. Sulfaquinoxalina

Os resultados das análises do tratamento no qual as aves receberam sulfaquinoxalina na água de beber encontram-se descritos na Tab. 12 e Fig 18. Neste grupo, as maiores concentraoes foram encontradas nos dois últimos dias de tratamento das aves (dias 33 e 34 de criaao) ($P < 0,05$) e, após a retirada do medicamento, as concentraoes de resíduos no músculo dos frangos de corte declinaram rapidamente.

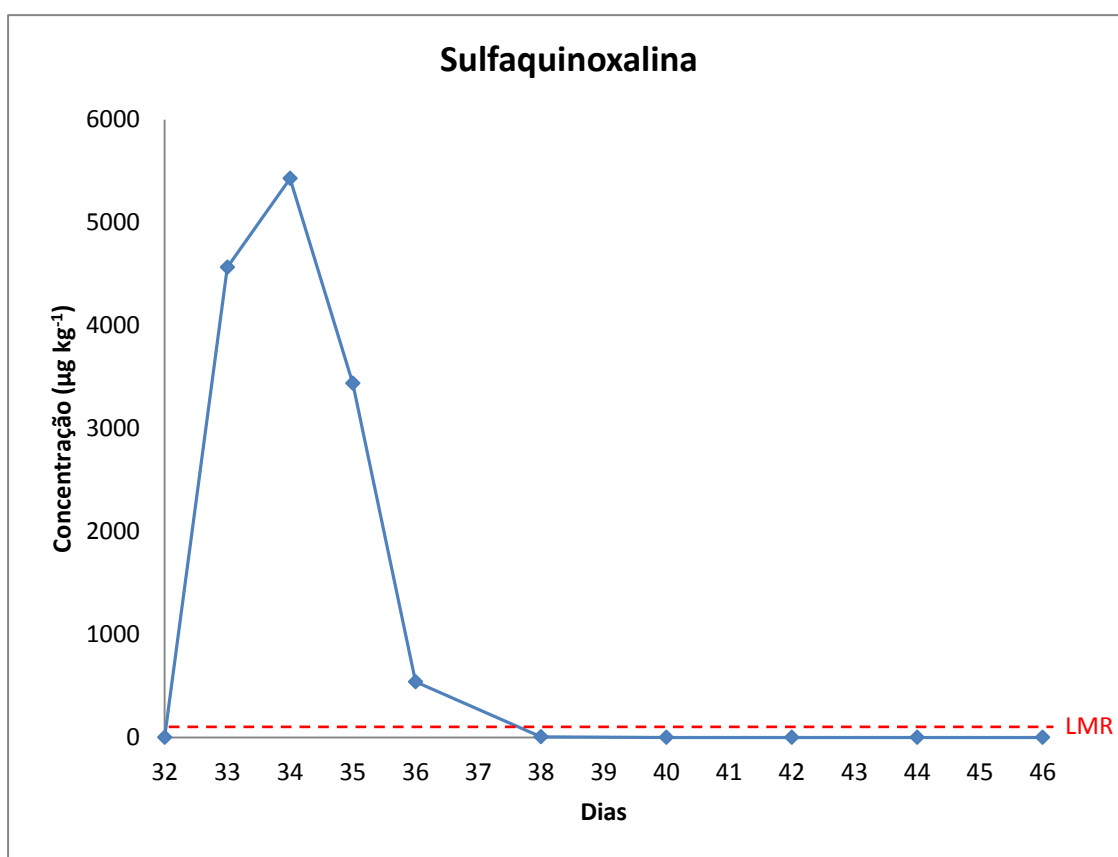
Tabela 12. Resultados das concentrações médias de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisados pelo método validado de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual

Dia de tratamento	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
32	ND a
33	4565,472 b
34	5428,415 b
35	3438,690 a
36	539,364 a
38	< LQ a
40	ND a
42	ND a
44	ND a
46	ND a

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

LQ: limite de quantificação = $20,34 \mu\text{g kg}^{-1}$; ND: $< 6,71 \mu\text{g kg}^{-1}$

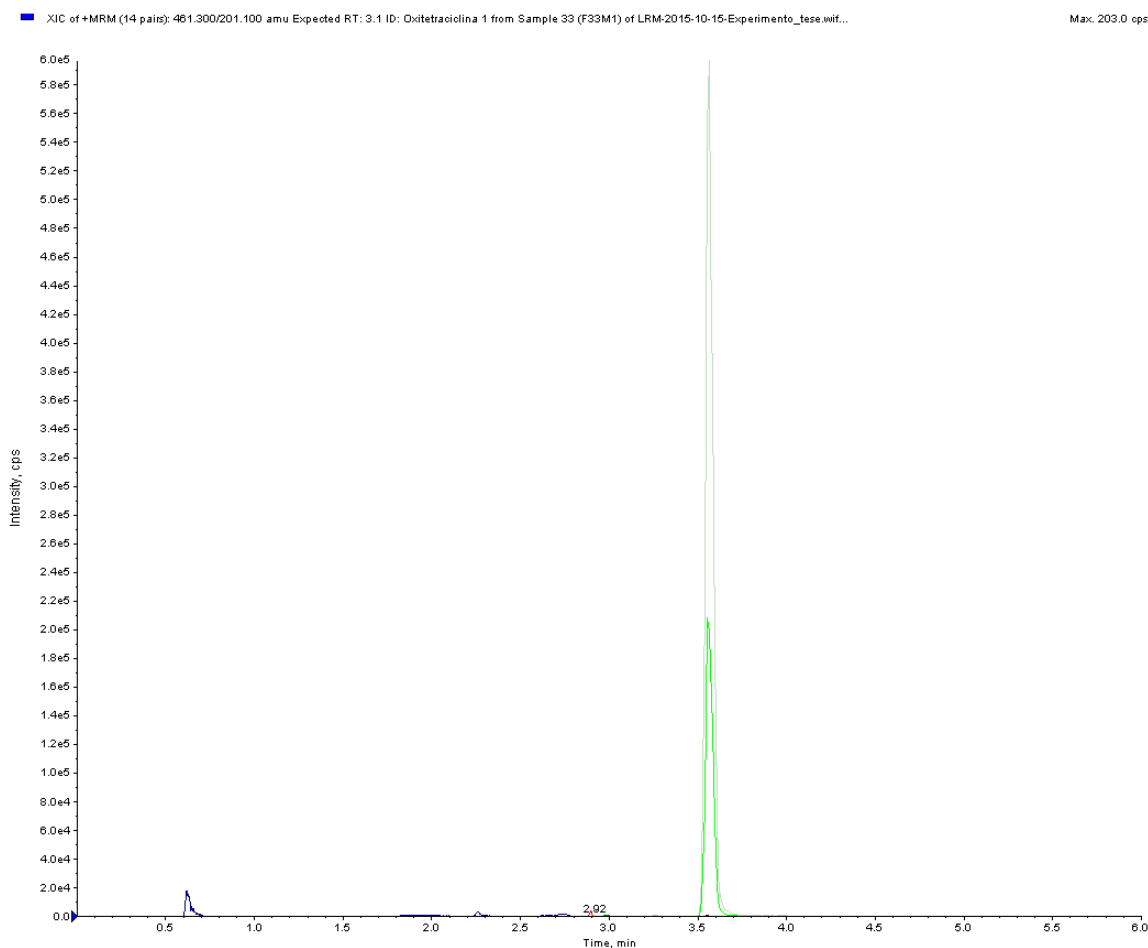
Figura 18. Concentrações médias de resíduos do antimicrobiano sulfaquinoxalina analisados pelo método de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual



O LMR estabelecido pelo Regulamento N.º 37/2010 da União Europeia e pelo PNCRC do Brasil para as sulfonamidas é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EC, 2009; BRASIL, 2015). No quarto dia após o término do tratamento (38º dia de criação), o teor encontrado foi inferior ao LMR estabelecido (Fig. 18).

O cromatograma representado na Fig. 19 ilustra o resultado da análise de uma amostra de músculo coletada no dia 33, pertencente ao grupo no qual os animais receberam sulfaquinoxalina. A quantificação dos analitos baseia-se na relação entre área do pico e concentração e a presença de um pico com alta intensidade de sinal ilustra os teores de sulfaquinoxalina encontrados neste dia de análise. Segundo Korolkovas e França (2002), após a administração via oral, as sulfonamidas são rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal; aproximadamente 70% a 100% da dose oral sofre absorção e o fármaco é distribuído por todos os tecidos.

Figura 19. Cromatograma da análise de amostra de músculo de frangos de corte tratados com sulfaquinoxalina na água de beber, coletada no 33º dia de criação



As sulfonamidas são utilizadas na avicultura como agentes terapêuticos para o controle da coccidiose, pulorose, tifo aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas. Os resultados do monitoramento do PNCRC divulgados pelo Brasil para o ano de 2014, demonstram a importância da sulfaquinoxalina como agente terapêutico na avicultura industrial, pois das 215 amostras de fígado analisadas para pesquisa de sulfonamidas, foram encontradas três amostras violadas, nas concentrações de 168,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 150,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 169,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Uma das características farmacocinéticas importantes das sulfonamidas é sua eliminação por meio das fezes e urina. Desta maneira, segundo Landoni e Albarellos (2015), o hábito de coprofagia dos frangos de corte pode aumentar o tempo de permanência da droga no organismo animal e, por este motivo, é indicado o cumprimento do período de carência mínimo de 10 dias. O fabricante do produto comercial utilizado no presente trabalho também recomenda o período de retirada de dez dias. No entanto, no presente trabalho, este longo período de permanência da droga no organismo do animal não foi observado, pois no quarto dia após o término do tratamento, as concentrações encontradas foram inferiores ao limite de quantificação do método.

5.2.3. Oxitetraciclina

Os resultados das análises de oxitetraciclina em músculo de frangos de corte que receberam este medicamento na água de beber encontram-se descritos na Tab. 14 e Fig. 20. As maiores concentrações de resíduos de oxitetraciclina ($P < 0,05$) foram observadas durante os dois últimos dias de tratamento (dias 33 e 34 de criação). No grupo de animais tratados com este medicamento, as concentrações de resíduos encontradas no músculo foram baixas quando comparadas aos teores observados nos demais tratamentos.

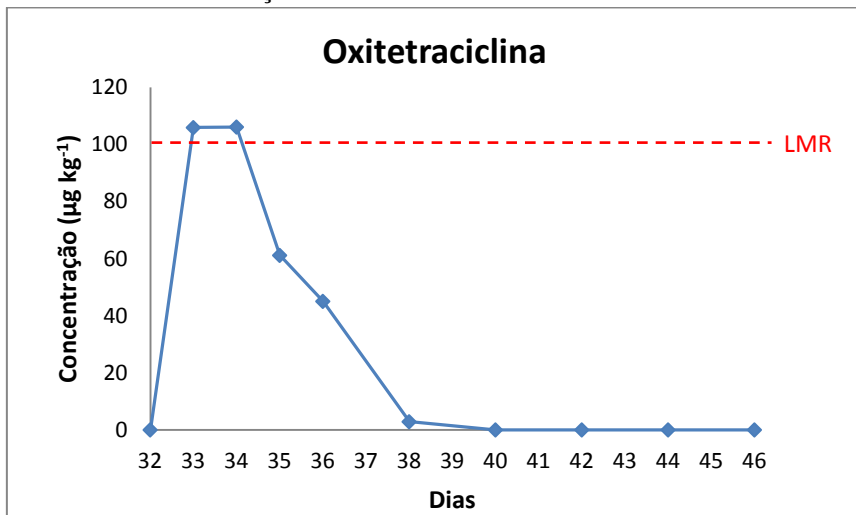
Tabela 13. Resultados das concentrações médias de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados pelo método validado de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual

Dia de tratamento	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
32	ND a
33	105,913 b
34	106,106 b
35	61,156 a
36	45,044 a
38	<LQ a
40	ND a
42	ND a
44	ND a
46	ND a

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

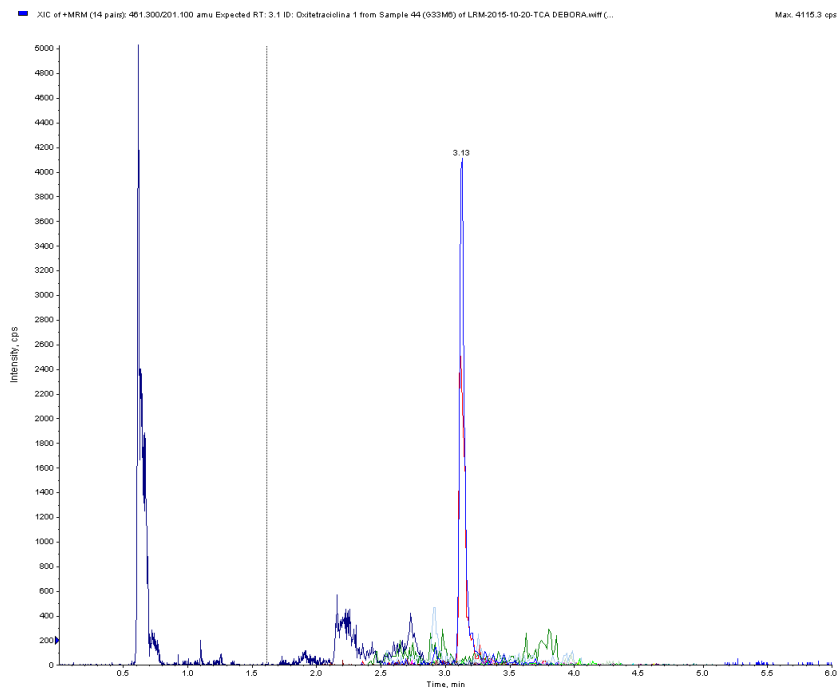
LQ: limite de quantificação = 9,46 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ND: < 3,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Figura 20. Concentrações médias de resíduos do antimicrobiano oxitetraciclina analisados pelo método de UPLC-MS/MS na matriz músculo de frangos de corte, durante os períodos de tratamento e de avaliação residual



As concentrações de resíduos de oxitetraciclina encontradas também estão demonstradas no cromatograma representado na Fig. 21, que ilustra a análise de uma amostra de músculo de frangos de corte tratados com oxitetraciclina, coletada no 33º dia de criação. O cromatograma da análise desta amostra apresentou menor área do pico quando comparado aos cromatogramas das análises de amostras obtidas a partir dos animais tratados com enrofloxacina e sulfaquinoxalina.

Figura 21. Cromatograma da análise de amostra de músculo de frangos de corte tratados com oxitetraciclina na água de beber, coletada no 33º dia de criação



O LMR determinado pelo PNCRC para a oxitetraciclina na matriz músculo de ave é de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valor superior ao estabelecido pela Comunidade Europeia, de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Segundo os valores estabelecidos pelo PNCRC, as amostras analisadas seriam consideradas conformes inclusive durante os dias de tratamento (EC, 2009; BRASIL, 2015a). Desta maneira, considerando a utilização adequada do medicamento, respeitando as dosagens recomendadas e o cumprimento do período de retirada, o LMR estabelecido pelo PNCRC para a oxitetraciclina pode ser reduzido e igualado aos valores preconizados pela Comunidade Europeia sem comprometer as ações de monitoramento.

Apesar da oxitetraciclina, devido a seu amplo espectro de ação, ser amplamente utilizada na avicultura industrial, ao avaliar os resultados do monitoramento divulgados pelo Brasil para o ano de 2014, foi encontrada apenas uma amostra de músculo de ave violada, na concentração de 241,67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2015b).

Landoni e Albarellos (2015) afirmaram que o período de retirada da oxitetraciclina é de sete dias e, de acordo com o fabricante do produto comercial utilizado para o tratamento das aves no presente trabalho, deve ser respeitado o período de carência de cinco dias. No entanto, amostras com concentrações acima do LMR de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, estabelecido pelo Regulamento nº 37/2010 da Comunidade Europeia (EC, 2009), foram detectadas apenas durante o período de tratamento das aves e, apesar dos teores ultrapassarem o LMR, estas amostras podem ser consideradas conformes, pois as concentrações observadas foram inferiores ao CC α do método para a oxitetraciclina, de 113,22 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O cálculo deste parâmetro é recomendado pela Decisão 657/2002/CE e indica a concentração a partir da qual se pode decidir, com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o limite permitido foi realmente excedido (EC, 2002). No 38º dia de criação das aves, quatro dias após o término do medicamento, as concentrações de resíduos encontradas foram inferiores ao limite de quantificação do método para esta droga, de 9,46 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A oxitetraciclina é a menos lipofílica do grupo das tetraciclina, e, portanto, a que possui menor taxa de absorção após a administração via oral (Ito et al., 2005; Goetting et al., 2011; Spinosa e Tárraga, 2011), o que pode justificar os resultados encontrados.

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

No presente trabalho, resíduos dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina e sulfaquinoxalina estavam presentes, em concentrações acima dos LMR de cada droga, até o 36º de criação das aves, isto é, dois dias após o término do tratamento dos animais e, a partir do 38º dia de criação, as concentrações observadas foram inferiores ao limite de quantificação do

método para estes medicamentos. Concentrações de oxitetraciclina acima do LMR foram observadas apenas durante o período de tratamento das aves.

Os avanços tecnológicos nas áreas de genética e nutrição permitiram que as linhagens de frango de corte atingissem altas taxas de eficiência alimentar e altas taxas de crescimento, alcançando em poucas semanas peso ideal para abate. Na década de setenta, o peso médio ao abate, de 1,5 kg, era conseguido em 70 dias e, atualmente, o peso médio de abate, que aumentou para 2,5 kg, é atingido em 42 dias. No frango de corte atual, o desenvolvimento muscular é muito rápido e a taxa de metabolismo acelerada; essa alta taxa metabólica pode ter contribuído para a rápida eliminação dos resíduos de medicamentos na musculatura dos animais.

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

6. CONCLUSÃO

O método de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC/MS-MS) apresenta as características de desempenho necessárias e foi validado, sendo adequado para a pesquisa de resíduos de enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina em músculo de frangos de corte.

O estudo de depleção demonstra que os resíduos dos antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfaquinoxalina e oxitetraciclina são rapidamente metabolizados pelos frangos de corte, pois quatro dias após o período de retirada dos medicamentos, as concentrações de resíduos encontradas foram inferiores ao limite de quantificação do método para todos os analitos estudados.

Estudos adicionais, utilizando outras matrizes, tais como o fígado e rim, são necessários para o estabelecimento de períodos de carência adequados visando à segurança na utilização de antimicrobianos na produção de frangos de corte.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatórios Anuais. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuaispublicacoes_relatoriosanuais.php> Acesso em 02 novembro de 2015.

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

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

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

BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 384, p. 85-89, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 51 de 06 de maio de 1986. Dispõe sobre a instituição do Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 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 1995, Seção 2, p.6048.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acessado em 10 outubro 2015.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de fiscalização de produtos veterinários. Relatório de produtos com licença vigente. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao/listas%20de%20produtos/Produtos%20Vigentes-%20Abril-2014.pdf>. Acesso em 20 outubro 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 13, de 15 de julho de 2015. Publica o subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC de 2015 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos, na forma do Anexo desta Instrução Normativa, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 julho 2015a, Seção 1, p.5

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA N° 22, de 07 de abril de 2015. Divulgar os resultados do subprograma de monitoramento e do subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC do ano

2014, das cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, de ave e de avestruz e cadeias de leite, ovos, mel e pescado, na forma dos Anexos I e II desta Portaria. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de abril de 2015b, Seção 1.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.

CALDEIRA, L. G. M. Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. 2012. 138f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CETINKAYA, F.; YIBAR, A.; SOYUTEMIZ, G.E.; OKUTAN, B.; OZCAN, A.; KARACA, M.Y. Determination of tetracycline residues in chicken meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part B*, v. 5, p. 45-49, 2012.

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. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.

CODEX - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71-2009, p.38, 2009.

CODEX - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2015.

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

COSTA-BATLLORI, P. Sulphonamides as therapeutic agents. Las sulfonamidas: Actualidad como agentes terapeuticos 13, 585-589, 1996.

CUNHA, M. R. R. Análise de multirresíduos de antibióticos anfencóis e β -lactâmicos em leite por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de massas. 2009. 172p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DAFT B. M.; BICKFORD, A. A.; HAMMARLUND, M. A. Experimental and field sulfaquinoxaline toxicosis in leghorn chickens. *Avian Dis.* v.33, p. 30-34, 1989.

DE LA CRUZ, M. N. S; SOARES, R. F., MARQUES, A. S. F. et al. Development and Validation of Analytical Method for Sulfonamide Residues in Eggs by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry based on the Commission Decision 2002/657/EC. *J. Brazil. Chem. Soc.*, v.22, n.3, p.454-461, 2011.

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

DOYLE, M. E. Veterinary Drug Residues in Processed Meats – Potential Health Risk (A Review of the Scientific Literature). 2006. Disponível em: <http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_VetDrgRes.pdf>. Acesso em 14 outubro de 2015.

EC - COMISSÃO das Comunidades Europeias. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 221, p. 8-36, 2002.

EC - Regulamento (CEE) nº 37/2010 – REGULAMENTO (UE) Nº. 37/2010 DA COMISSÃO de 22 de Dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.

ERSHOV, E., BELLAICHE, M.; HANJI, V.; SOBACK, S.; GIPS M.; SHLOSBERG, A. Interaction of fluoroquinolones and certain ionophores in broilers: effect on blood levels and hepatic cytochrome P450 monooxygenase activity. *Drug Metabol. Drug Interact.*, v.18, p. 209-219, 2001.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation. Teddington: LGC, 1998, 62p.

FDA, Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Enrofloxacin for Poultry: Notice of Hearing, 2005. Disponível em <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2002-02-20/html/02-4082.htm>>. Acessado em 20 outubro de 2015.

FURUSAWA, N.; HANABUSA, R. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food Res. Int.*, v. 35, p. 37-42, 2002.

FURUSAWA, N.; TSUZUKIDA, Y. Tissue concentrations of sulphaquinoxaline administered in the food of laying hens. *Brit. Poultry Sci.*, v.39, p. 683-685, 1998.

GIBSON, R.; COOPER, K.M.; KENNEDY, D.G.; ELLIOTT, C.T. Mass spectrometric analysis of muscle samples to detect potential antibiotic growth promoter misuse in broiler chickens. *Food Addit Contam Part A.*, v. 29, p. 1413–1424, 2012.

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

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

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

GUSTAFSON, R.H.; BOWEN, R.E. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.*, v.83, p.531–541, 1997.

HAGER, J. W.; LE BLANC JC, Y. Product ion scanning using a Q-q-Q linear ion trap (Q TRAP) mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 17, p. 1056-64, 2003.

HARMS, R. H.; WALDROUP, P. W. Potentiation of terramycin. Evaluation of terephthalic acid and low dietary calcium in broiler diets. *Avian Dis.*, v. 5, p.183-188, 1961.

HEITZMAN, R. J. Enrofloxacin. In: RESIDUES OF SOME VETERINARY DRUGS IN FOODS AND ANIMALS. FAO Food and Nutrition Paper 41/10, 1997, pp. 31-44. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/en/>>. Acessado em: 20 set. 2015.

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

HOFFMANN, E. Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* v. 31; p.129-137, 1996.

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; GRAHAM COOKS, R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* v.40, p.430-43. 2005.

ICH, International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/>> Acesso em: 05 de outubro de 2015.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2010. Orientações sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 04, julho/2011, p.20, 2011.

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

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

KOROLKOVAS, A; FRANÇA, F. F. A. C. Dicionário Terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrom Rev.* v. 25, p. 866-80, 2006.

LANÇAS, F. M. “Cromatografia em Fase Gasosa”, Acta, 1993.

- LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos, SP: RiMa, 2004. p. 62.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v.1, p.35-61, 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, 2013.
- LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet J.*, v. 205, p. 21-7, 2015.
- LENDIA, B.E.; MEYER, V.R. The UV detector for HPLC – an ongoing success story. *LC GC Europe* v.18, p.156, 2005.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quím. Nova*, v. 32, p. 214-222, 2009.
- MCMASTER, M. *LC/MS: A Practical User's Guide*, Wiley-Interscience, 2005.
- 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. *J. Food Prot.*, v. 61, n. 6, p.742-756, 1998.
- NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta*, v. 656, p. 8-35, 2009.
- NIESSEN, W.M.A., “Liquid Chromatography-Mass Spectrometry”, Third Edition (Chromatographic Science). Boca Raton: CRC Press, 2006.
- NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C. P. B.; LUCCI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J. Chrom. A*, v. 1228, p. 298-323, 2012.
- PALERMO-NETO, J; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 608-629.
- PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Fluoroquinolone Antimicrobial Drugs. In: ADAMS, H. R. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2001, 917p.
- 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. *Quím. Nova*. v. 31 n. 5, p. 1190-1198, 2008.
- PATURKAR, A. M.; WASKAR, V. S.; MOKAL, K. V.; ZENDE, R. J. Antimicrobial drug residues in meat and their public health significance – a review. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 75, n. 9, p. 1103-1111, 2005.

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

PICÓ, Y. Análise química de alimentos: Técnicas. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 368.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS—um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova*, v.32, p.1620–1634, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*. v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J. Chromatogr. A*, v. 1156, p. 201-205, 2007.

SHEN, J.; GUO, L.; XU, F.; RAO, Q.; XIA, X.; LI, X.; DING, S. Simultaneous Determination of Fluoroquinolones, Tetracyclines and Sulfonamides in Chicken Muscle by UPLC–MS–MS. *Chromatographia*, v.71, p. 383-388, 2010.

SHLAES, D. M. An update on tetracyclines. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. v.7, p.167–171, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; Princípios de Análise Instrumental, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.

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

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

SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento. Belo Horizonte, 2007. 297 f. (Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *J. Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 5, p. 835- 855, 2002.

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

WALTHER, T. C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* v.190, p. 491-500, 2010.

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 85, p. 5288-5296, 2013.