

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FÁRMACIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS (COCCIDIOSTÁTICOS,
QUINOLONAS E SULFONAMIDAS) EM OVOS DE GALINHA POEDEIRA
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (CLAE-EM/EM)**

DIANA ALVES DE SOUSA

Porto Alegre – RS

Março, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FÁRMACIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS (COCCIDIOSTÁTICOS,
QUINOLONAS E SULFONAMIDAS) EM OVOS DE GALINHA POEDEIRA
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (CLAE-EM/EM)**

Dissertação apresentada por Diana Alves de
Sousa como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Profa. Dra. Ana Maria Bergold
Orientadora

Dr. Fabiano Barreto
Coorientador

Porto Alegre- RS

Março, 2017

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre Março/2015 e Março/2017, no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM) do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS) com recursos provenientes desta Instituição. A dissertação foi apresentada e aprovada com voto de louvor em 16 de Março de 2017, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela banca examinadora constituída:

Profa. Dra. Eliane Dallegrave

Universidade Federal de Ciências e Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Dr. Rodrigo Barcellos Hoff

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA)

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Alves de Sousa, Diana
Determinação de Multirresíduos (Coccidiostáticos,
Quinolonas e Sulfonamidas) em Ovos de Galinha
Poedeira por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem (CLAE-
EM/EM) / Diana Alves de Sousa. -- 2017.
140 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.
Coorientador: Fabiano Barreto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Química Instrumental. 2. Resíduos de
Medicamentos Veterinários. I. Bergold, Ana Maria,
orient. II. Barreto, Fabiano, coorient. III. Título.

Ao meu esposo, amigo e companheiro Assis Rogério, pelo amor, carinho, paciência e consolo em todos os momentos desde o instante em que nos conhecemos. E, em especial por todo incentivo e apoio para a concretização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Ana Maria Bergold por confiar e conceder a oportunidade para a realização deste projeto;

Ao meu coorientador Doutor Fabiano Barreto por ter acreditado e contribuído para o meu desenvolvimento profissional, por sua dedicação e seu comprometimento em compartilhar o seu conhecimento e experiência;

Aos professores dos programas de pós-graduação da UFRGS, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e Programa de Pós Graduação em Química que contribuíram com o ensino de qualidade e pela oportunidade;

Aos colegas do Laboratório de Produção de Substâncias Químicas de Referência e do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, que apesar do pouco convívio sempre foram receptivos e prontos para colaborar;

Aos amigos, da generosa e competente equipe do RPM, que me acolheram e me orientaram no período que estive no laboratório desenvolvendo todas as etapas experimentais deste trabalho, especialmente a Caroline Tomaszewski, Cláudia Nunes, Cristina Ribeiro, Daniel Hillesheim, Fabiano Barreto, Gabriel Rübensam, Leonardo Meneghini, Louise Jank, Magda Targa Martins, Marcos Colombo, Tamara Castilhos, Tanara Magalhães Campos Motta, Renata Rau e Vinícius Bicca, que inúmeras vezes me ajudaram através das atitudes e palavras de motivação;

Ao LANAGRO/RS, por disponibilizar todos os recursos (instrumental, técnico e financeiro) necessários para a realização deste projeto;

Aos membros da banca pelas sugestões e críticas para o sucesso deste documento;

Às pessoas que não foram citadas e que de alguma maneira colaboram para a realização deste projeto;

A concretização satisfatória deste projeto por minha pessoa, Diana Alves de Sousa, só possível por existirem todas estas pessoas na minha vida;

A todas as pessoas, gratidão.

“Do not confuse the word “belief” with the word “wish”. The two are not the same ... the element of faith is the only sure power by which a wish may be translated into a belief, and a belief into reality.”

Napoleon Hill

RESUMO

Determinação de Multirresíduos (Coccidiostáticos, Quinolonas e Sulfonamidas) em Ovos de Galinha Poedeira por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de massas em *Tandem* (CLAE-EM/EM)

Palavras-chave: coccidiostáticos, quinolonas, sulfonamidas, ovos, CLAE-EM/EM.

Devido às condições de produção intensivas, os medicamentos veterinários têm sido uma importante ferramenta no controle de enfermidades, aumento de produtividade e redução de mortalidade em animais de produção. Assim, na produção de ovos também ocorre o uso intensivo destes medicamentos. Para assegurar o atendimento de requisitos de sanidade e inocuidade, a avaliação dos níveis de resíduos de medicamentos veterinários utilizados é imprescindível, bem como, o atendimento dos níveis máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos. O controle dos níveis de resíduos, em especial dos antimicrobianos, representa importante ação de saúde pública, sendo de grande relevância nos últimos anos para o controle dos altos níveis de resistência bacteriana reportada e atribuídos ao uso indiscriminado desta classe.

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia multirresíduos para o monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários pertencentes às classes dos coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas, que fosse precisa, rápida, aplicável ao processamento de um grande número de amostras de ovos e que fornecesse dados quantitativos e confirmatórios da presença destes antimicrobianos em ovos.

O trabalho foi realizado em três etapas distintas. Inicialmente foi realizado o desenvolvimento do método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (CLAE-EM/EM) para análise quantitativa confirmatória das classes em estudo. Na etapa II, otimizado o protocolo de extração, purificação e concentração dos resíduos de medicamentos veterinários pertencentes às classes de interesse, na matriz (ovos de galinhas poedeiras). Por último, o método foi validado de acordo com a Diretiva da Comissão Européia 2002/657/CE, que estabelece os critérios mínimos de desempenho para métodos de

análise de resíduos de medicamentos de uso veterinário em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano.

O método desenvolvido se mostrou adequado, apresentando Limite de Quantificação (LQ) de $2,5\mu\text{g.kg}^{-1}$ para todos os compostos pertencentes às três classes de medicamentos veterinários (coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas). Amostras coletadas em estabelecimentos de produção comercial de ovos sob supervisão do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e destinadas ao Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) puderam ser analisadas, quantificadas e a presença de resíduos confirmada através da aplicação da metodologia desenvolvida.

ABSTRACT

Determination of Multiresidues (Coccidiostats, Quinolones and Sulfonamides) in laying hen eggs by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Tandem (HPLC-MS/MS)

Keywords: coccidiostats, quinolones, sulfonamides, eggs, HPLC-MS / MS.

Due to intensive production conditions, the veterinary drugs have been an important management tool in disease control, productivity increase and mortality reduction in farm animals. Therefore, intensive use of these compounds also occurs in the egg production. To ensure compliance of health requirements and safety, the assessment of residue levels of veterinary drugs used in food-producing animals is essential, as well as the compliance with the maximum residue levels (MRLs) established. The control of residue levels, particularly of antimicrobials, is a major public health action, being of great importance in recent years for the control of bacterial resistance emergence which could be attributed to the indiscriminate use of veterinary drugs as one of the causes.

The objective of this work was the development and validation of a fast and accurate high-throughput multiresidues method for monitoring residues of veterinary drugs belonging to coccidiostats, quinolones and sulfonamides classes, applicable to provide quantitative and confirmatory data of those antibiotics incidence in eggs.

The study was conducted in three distinct stages. Initially was performed the development of the method using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for quantitative and confirmatory analysis of the classes under consideration. In Step II, extraction, purification and concentration protocol of veterinary drugs residues belonging to the compounds of interest in eggs samples were optimized. Finally, the method was validated according to the European Commission Directive 2002/657/EC, which preconize minimum performance criteria of analytical methods for veterinary drugs residues determination in food.

The method developed was adequate, with a limit of quantification (LQ) of 2.5 μgkg^{-1} for all compounds belonging to the three classes of veterinary drugs (coccidiostats, quinolones and sulfonamides). Samples were collected in commercial

production establishments under supervision of the Federal Inspection Service (SIF) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) and destined to the National Residues Control Plan (PNCRC). Positive samples could be analyzed, quantified and residues presence confirmed through the application of the developed method.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHHMD – *Dihydropteroate*

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais

AMP – Amprólio

BUQ – Buquinolato

CE – Comunidade Européia

CIP – Ciprofloxacino

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM/EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas em *Tandem*

CLOP – Clopidol

CYR – *Cyromazine*

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DAN – Danofloxacino

DEC – Decoquinato

DF – Detector de Fluorescência

DHPS – Enzima *Dihydropteroate Synthase*

DIA – Diaveridina

DIC – Diclazuril

DIF – Difloxacino

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNC – 4,4 dinitrocarbanilida

DNI – *Dinitomide*

EC – *European Commission*

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EM – Espectrometria de Massas

EM/EM – Espectrometria de Massas em *Tandem*

ENR – Enrofloxacino

ETO – Etopabato

FLU – Flumequina

FQs – Flurquinolonas

HFG – Halofuginona

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-MS/MS - *High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

IMID – Imidocarb Dipropionato

LAID – *Laidlomycin*

LANAGRO/RS – Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul

LAS – Lasalocida

LMRs – Limite Máximo de Resíduos

LQ – Limite de quantificação/ *Limit of quantification*

MAD – Maduramicina

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAR – Marbofloxacino

MCs – Macrolídeos

MRL – *Maximum Residue Level*

MON – Monensina

MS – *Mass Spectrometry*

MS/MS – *Tandem Mass Spectrometry*

MVs – Medicamentos Veterinários

NAL – Ácido Nalidixíco

NAR – Narasina

NEQ – Nequinato

OXO – Ácido Oxoliníco

PABA – ácido para-aminobenzóico

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RNA – Ácido Ribonucleico

ROB – Robenidina

ROX – *Roxarsone*

RPM – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários

SAL – Salinomicina
SAR – Sarafloxacino
SAs – Sulfonamidas
SCPD – Sulfaclopirimidazina
SCPZ – Sulfaclopirazina
SDM – Sulfadimetoxina
SDZ – Sulfadiazina
SEM – Sempduramicina
SFZ – Sulfafenazol
SMM – Sulfamonometoxina
SMP – Sulfametoxipirimidazina
SMT – Sulfametazina
SMX – Sulfametoxazol
SMZ – Sulfamerazina
SQX – Sulfaquinoxalina
STZ – Sulfatiazol
TCs – Tetraciclínas
THF – Ácido tetrahidrofólico
TOL – Toltrazuril
UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação geral de quinolonas.	42
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação das sulfonamidas.	43
Figura 3: Estruturas moleculares dos ionóforos naturais.	52
Figura 4: Estruturas moleculares dos coccidiostáticos sintéticos.	53
Figura 5: Estrutura molecular principal das quinolonas.	54
Figura 6: Estruturas moleculares de alguns antimicrobianos da classe das quinolonas e fluorquinolonas.....	55
Figura 7: Estruturas moleculares de algumas sulfonamidas.	57
Figura 8: Ocorrência de contaminação em ovos com antimicrobianos no período de Julho/2015 à Dezembro/2016.....	71
Figura 9: Ocorrência de mais de um antimicrobiano quantificado em ovos.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos antimicrobianos do grupo das quinolonas. Seguem alguns exemplos.	49
Tabela 2: Comparação da lista de compostos monitorados conforme IN N°11 MAPA e os compostos incluídos na metodologia analítica desenvolvida nesse trabalho.....	67
Tabela 3: Lista de produtos comerciais disponibilizados no SIDAN de uso em aves.....	74
Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.....	133

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
3.1. Mecanismo de Ação dos Fármacos Veterinários	39
A. Coccidiostáticos	39
B. Quinolonas	40
C. Sulfonamidas	42
3.2. Medicamentos Veterinários (MVs) Utilizados na Medicina Aviária	43
A. Coccidiostáticos	44
B. Quinolonas	46
C. Sulfonamidas	49
3.3. Propriedades Físico-Químicas	51
A. Coccidiostáticos	51
B. Quinolonas	54
C. Sulfonamidas	56
3.4. Metodologias Analíticas Aplicadas no Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários	58
4. DISCUSSÃO GERAL	63
5. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS DO PNCRC 2015/2016	69
6. ARTIGO	75
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
9. APÊNDICE.....	131

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 1950, um grande número de medicamentos veterinários (MVs) tem sido utilizado a fim de melhorar a saúde dos animais, e também como promotores de crescimento na produção intensiva (AGARWAL, 1992; BOSCHER et al., 2010; AGUILERA-LUIZ et al., 2012; CAPRIOTTI et al., 2012). A utilização generalizada, principalmente dos antimicrobianos, é claramente inevitável dentro do modelo produtivo convencional (sistema intensivo) (ZHANG et al., 2016). Embora o uso de MVs tenha contribuído para o aumento da produtividade, consequências negativas tais como a presença de resíduos de medicamentos em alimentos destinados para consumo humano - incluindo carne, peixe, leite e ovos - não pode ser ignorada (AGARWAL, 1992; BOSCHER et al., 2010).

Visando a segurança dos consumidores, avaliações baseadas em análise de risco são realizadas para definição de parâmetros e níveis regulatórios para a gestão de risco. Diferentes organismos no âmbito internacional e nacional são responsáveis pela implementação de limites máximos de resíduos (LMRs) dos medicamentos, quando estes são aplicáveis. O LMR é definido como sendo a concentração máxima de resíduo resultante da utilização de um medicamento veterinário que é aceitável em um alimento (MACLACHLAN; MUELLER, 2012). A tendência de proibição do uso de determinados compostos e a redução dos níveis de ação regulatória estão diretamente ligadas à capacidade técnica disponível para determinação de concentrações na faixa de partes por bilhão. Neste contexto, técnicas sensíveis como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas são fundamentais para atingir os níveis necessários (AGARWAL, 1992; BOSCHER et al., 2010; ZHANG et al., 2016).

Os possíveis perigos à saúde humana traz o uso indevido de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, tais como o aumento do risco de desenvolver alergias em indivíduos sensibilizados ou com hipersensibilidade, carcinogenicidade e o desenvolvimento de cepas resistentes de bactérias a agentes antimicrobianos. Os riscos relacionados aos resíduos de MVs em níveis acima dos limites máximos recomendados podem ocorrer quando o emprego do produto não observa as Boas Práticas Agropecuárias, como por exemplo, o não cumprimento dos períodos de carência, o uso de substâncias não autorizadas, ou contaminação cruzada não intencional de linhas de produção de rações destinadas aos animais. Para

medicamentos autorizados, há a definição de períodos de carência (ou retirada), que significa o tempo a ser observado entre a última administração e a destinação dos animais ao abate ou coleta dos produtos (mel, leite, ovos) ao consumo humano (AGARWAL, 1992; BOSCHER et al., 2010; CAPRIOTTI et al., 2012).

O monitoramento da ocorrência de resíduos de MVs em produtos de origem animal é imprescindível para mitigar a introdução na cadeia de substâncias não autorizadas ou em concentrações acima dos limites regulatórios definidos que possam acarretar em efeitos deletérios à saúde dos consumidores (BOSCHER et al., 2010). O conhecimento da dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle e gestão de risco visando à proteção do consumidor (ANVISA, 2003).

Alinhado com as políticas internacionais voltadas à segurança dos alimentos, no Brasil são executadas ações de monitoramento da ocorrência de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal. É por meio de programas de monitoramento mantidos pelos diferentes agentes, como é o caso do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) mantido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que é possível identificar o perfil de incidência e dar o suporte para a tomada de decisões assegurando que o produto que chega ao consumidor tanto interno quanto externo está isento de resíduos de MVs ou contaminantes em níveis não aceitáveis.

As análises oficiais dos diferentes programas de monitoramento e fiscalização mantidos pelo MAPA nas diferentes áreas, incluindo o controle de resíduos e contaminantes, são executadas pela Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, que é composta pelos Lanagros e laboratórios credenciados. Os Lanagros – Laboratórios Nacionais Agropecuários – são os laboratórios oficiais do MAPA. Os seis Lanagros estão localizados nas cinco regiões do Brasil, sendo dois na região Sudeste (Pedro Leopoldo/MG e Campinas/SP), um na região Sul (Porto Alegre/RS), um no Centro-Oeste (Goiânia/GO), um no Nordeste (Recife/PE) e um no Norte (Belém/PA). O presente projeto foi realizado na unidade Lanagro no Rio Grande do Sul, localizada em Porto Alegre/RS.

Uma das características dos programas de monitoramento é o seu dinamismo. Anualmente as estratégias são revistas e novos compostos, são geralmente incluídos aos programas. Há uma pressão constante visando à obtenção de equivalência junto a importantes mercados consumidores. Assim, nos últimos anos observou-se uma demanda regular para a introdução de novos compostos e classes no monitoramento para a matriz ovos. Os custos operacionais relacionados aos programas de monitoramento são bastante elevados tanto em termos de estrutura laboratorial para a sua execução quanto em logística para encaminhamento das amostras devido à extensão territorial do País. A abordagem ideal para determinar resíduos de MVs em alimentos é a aplicação de métodos para múltiplas classes que permite a detecção de vários de compostos no processo analítico podendo ser agrupados em apenas uma amostra encaminhada ao laboratório. Quando avaliado o programa de monitoramento para o ano de 2014, a execução do mesmo era realizada de forma fragmentada: eram encaminhadas três (3) diferentes amostras para serem analisadas em três metodologias distintas e específica para cada classe (coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas) (IN 11 MAPA, 2014).

As análises multiclasses é uma tarefa difícil tendo em conta as diferentes propriedades físico-químicas das diferentes classes de compostos. A dificuldade no desenvolvimento de tais métodos multiclasse para determinação de antimicrobianos é agravada pelas baixas concentrações dos limites regulatórios definidos e a complexidade inerente da matriz por causa do alto teor de proteína e gordura (ZHANG et al., 2016). Assim, para atender às exigências regulatórias é necessário o desenvolvimento de métodos específicos e sensíveis para a determinação de MVs em alimentos de origem animal destinados à alimentação humana (LOPES et al., 2012).

O presente projeto buscou o desenvolvimento e a validação de uma metodologia que fosse eficiente e eficaz na análise quantitativa e confirmatória para todos os analitos antimicrobianos já contemplados no PNCRC, bem como para um escopo mais amplo, com a inclusão de outros compostos visando à ampliação significativa do número de substâncias monitoradas na matriz de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de metodologia multirresíduos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários pertencentes às classes dos coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-EM/EM para a identificação e quantificação de resíduos de coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas em ovos.
- Realização de análises em amostras oriundas da produção comercial de ovos, visando obter panorama sobre a incidência de resíduos das classes incluídas neste estudo em amostras reais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mecanismo de Ação dos Fármacos Veterinários

A. Coccidiostáticos

Os ionóforos atuam como transportadores por aprisionamento de cátions (de preferência sódio ou potássio), gerando assim *zwitterions* neutros (HANSEN et al., 2009), ou seja, os ionóforos são substâncias capazes de interagir estequiometricamente com íons metálicos, servindo assim como transportadores, por meio dos quais estes íons podem ser transportados através da camada lipídica bimolecular da membrana (OVCHINNIKOV, 1979; MCDOUGALD; SEIBERT, 1998).

Estes complexos são transportados através das membranas celulares de organismos procariontes e eucariontes que habitam o trato gastrintestinal, em troca de prótons, e, por conseguinte, alteram os gradientes iônicos e, em última instância, provocam a redução de energia e a morte celular (HANSEN et al., 2009). Desse modo, os ionóforos fornecem uma vantagem competitiva para certos microorganismos, em detrimento dos outros. Em geral, o metabolismo dos microorganismos selecionados favorece o animal hospedeiro (MCDOUGALD; SEIBERT, 1998). Qualquer consideração da ação dos ionóforos, portanto, deve concentrar-se no mecanismo de interação ionóforos com membranas biológicas (BERGEN; BATES, 1984).

A troca de cátions por prótons é mediada pelo ácido carboxílico dos ionóforos. O ciclo inicia o transporte da forma aniônica do ionóforo confinado na interface da membrana onde é estabilizada do meio ambiente polar para a superfície da membrana. Como um ânion, o ionóforo é capaz de emparelhar os íons com o cátion de metal à porção ácido carboxílico terminal ou em outros locais internos (BERGEN; BATES, 1984).

A formação do complexo cíclico cátion-ionóforo inicia-se com a ligação do cátion à camada lipofílica, podendo difundir-se para o interior através da estrutura da membrana biomolecular. Por último, o complexo atinge a face oposta da membrana onde é de novo submetido a um ambiente polar. As forças eletrostáticas que estabilizam o complexo não são maiores do que a ΔG° desfavorável (mudança de

energia livre de *Gibbs*) de ciclização e o ionóforo libera seu cátion e reverte para conformação acíclica de menor energia. Lá aguarda a próxima fase do ciclo de transporte (PRESSMAN, 1976). Uma característica marcante deste modelo é que o ionóforo deve estar na forma aniônica antes de se ligar ao cátion de metal (M^+). Além disso, a difusão através da membrana não pode ocorrer a menos que exista o ionóforo na forma protonada (ionóforo H^+) ou como um *zwitterion* (M^+ e ionóforo na forma aniônica) (PAINTER; POLLACK; PRESSMAN, 1982; BERGEN; BATES, 1984).

Os ionóforos não exibem a mesma afinidade para todos os cátions. A monensina media principalmente troca Na^+/H^+ , porque a afinidade de monensina por Na^+ é dez vezes maior do que para K^+ , cátion concorrente mais próximo (PRESSMAN, 1976). A lasalocida exhibe maior afinidade para K^+ e, igual afinidade para Ca^{2+} e Na^+ (BERGEN; BATES, 1984).

A monensina é um bom exemplo para representar o mecanismo de ação dos ionóforos, pois sua estrutura molecular (Fig.3, página 46) é constituída de dois anéis tetraidropirano, três anéis tetraidrofurano, um cetel, e um hemiacetal. Estes grupos são construídos em conjunto com um ácido carboxílico e vários grupos hidroxila para um propósito específico, que é o de complexação com íons de metal alcalino e em seguida o transporte através das membranas biológicas. É esta propriedade que lhes dá a sua poderosa ação biológica. Para penetrar uma membrana biológica com o auxílio de um antimicrobiano ionóforo, o íon metálico primeiro deve perder a sua água de hidratação, uma vez que reage com ionóforo. Em seguida, ele tem de se difundir através da membrana e ser submetido aos processos inversos na outra interface (RIDDELL, 2002).

B. Quinolonas

O mecanismo de ação principal das quinolonas é através da inibição de enzima DNA girase bacteriana; esta enzima possui função na replicação, recombinação e reparação do DNA principalmente na promoção e reversão da superespiralação negativa do DNA. Também atua na inibição da topoisomerase IV, de função similar à DNA-girase (DRLICA, 1999; SARRO; SARRO, 2001; CROSS JR, 2001; KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010), atuando nas fases finais da replicação do

DNA, que permitem a separação dos cromossomas interligados de modo que a segregação em células filhas pode ocorrer (CROSS JR, 2001). As quinolonas inibem as enzimas, estabilizando o complexo DNA-girase e topoisomerase IV-DNA, fazendo com que os complexos anteriormente reversíveis se tornem irreversíveis (CROSS JR, 2001).

A Figura 1 (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010) esboça o esquema do mecanismo de ação geral que as quinolonas utilizam para matar as células bacterianas. As quinolonas se ligam de uma forma não covalente, na interface clivagem e ligação das enzimas ao sítio ativo do DNA (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014), via ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e carboxila dos anéis quinolônicos e as bases do DNA. Os grupamentos adjacentes são unidos à mesma fita, orientados em sentidos opostos para evitar repulsão de cargas (DRLICA; ZHAO, 1997), sendo necessárias duas moléculas de quinolona para aumentar os níveis de quebra do DNA de fita dupla (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

Como resultado da intercalação, as quinolonas aumentam a concentração das enzimas no estado estacionário dos complexos de clivagem (fármaco-enzima-DNA) o que as torna potencialmente letais para as células. Assim, esses fármacos são denominados "venenos de topoisomerase" porque eles convertem as enzimas DNA girase e topoisomerase IV em toxinas celulares (DRLICA, 1999; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). Os complexos são convertidos em quebras cromossômicas permanentes. Por sua vez, a geração destas quebras de DNA desencadeia a reposta das vias de reparação do DNA. Se as quebras da cadeia sobrecarregarem estes processos, eles podem conduzir à morte celular (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

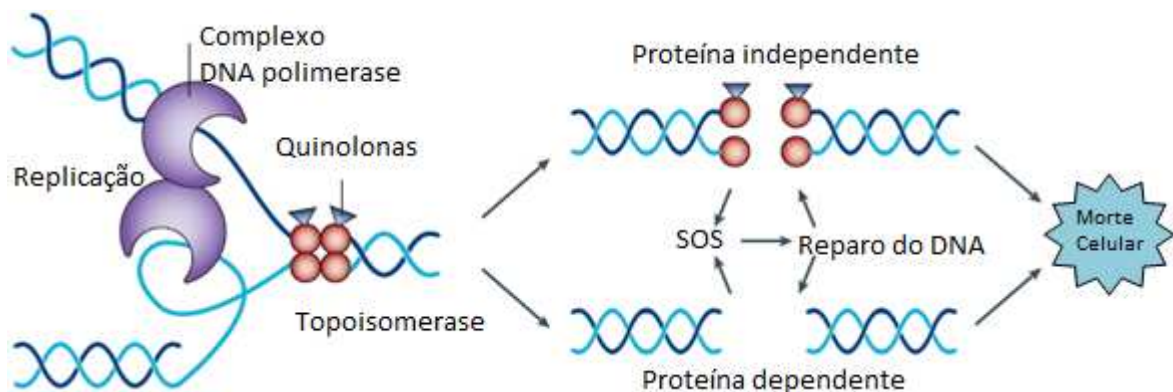


Figura 1: Mecanismo de ação geral de quinolonas.

Fonte: Adaptado de (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010).

C. Sulfonamidas

Como mostrado na Figura 2 (BARAN et al., 2011), antimicrobianos sulfonamídicos agem como inibidores competitivos da enzima diidropteroato sintase (DHPS) que catalisa a conversão de ácido p-aminobenzóico (PABA) para ácido diidropteróico, precursor da síntese de ácido fólico (WON et al., 2011; YU et al., 2011; BARAN et al., 2011). O ácido fólico participa na síntese dos ácidos nucleicos que são indispensáveis na construção dos blocos de DNA e RNA (BARAN et al., 2011). Isto leva a uma diminuição da disponibilidade dos folatos que são essenciais para o sistema de ácidos nucleicos (WON et al., 2011) e resulta na inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas (VALDERAS et al., 2008; GARCÍA-GALÁN et al., 2009). Sulfonamidas também inibem a permeabilidade do ácido glutâmico na parede celular bacteriana, que também é um componente essencial na síntese de ácido fólico. Dessa maneira inibem a multiplicação das bactérias. No entanto, sulfonamidas não inibem o crescimento de microrganismos que: obtêm o ácido fólico no ambiente, que possuem uma elevada concentração de PABA ou tem vias metabólicas modificadas (resistência a fármacos) (BARAN et al., 2011).

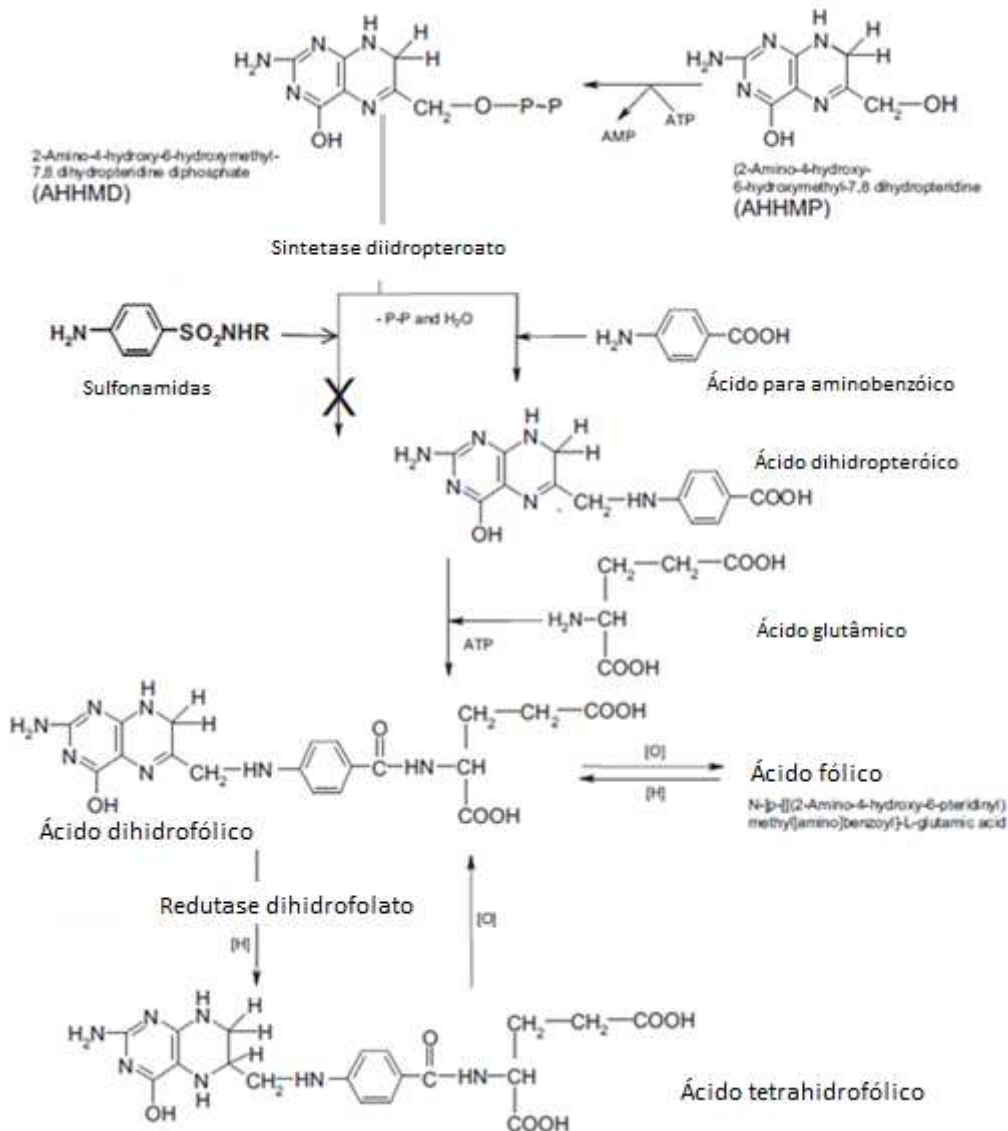


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação das sulfonamidas.

Fonte: Adaptado de (BARAN et al., 2011).

3.2. Medicamentos Veterinários (MVs) Utilizados na Medicina Aviária

Como já mencionado, MVs são amplamente utilizados em níveis terapêuticos nos sistemas de criação de animais para o tratamento de diferentes doenças, bem como aditivos alimentares visando a melhora de desempenho. Na produção de ovos comerciais, se sabe da dificuldade em não usar os medicamentos veterinários, sendo que as galinhas poedeiras são criadas em grande número e em uma área limitada e, em consequência, as doenças podem se espalhar rapidamente entre as aves

(PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016). Agentes antimicrobianos como os coccidiostáticos são comumente empregados no setor da pecuária, para galinhas poedeiras, para prevenir infecções bacterianas e coccidiose; outros MVs como as quinolonas e sulfonamidas, são utilizados para tratamento e prevenção de doenças sendo proibidos como aditivos no Brasil desde 2009, seguindo encaminhamento internacional como a decisão da CE em 2006 (IN 26 MAPA, 2009). Esta ampla utilização de agentes antimicrobianos pode conduzir à presença de resíduos em ovos além de outros impactos deletérios (GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; CAPRIOTTI et al., 2012).

A. Coccidiostáticos

As galinhas poedeiras são as espécies mais prováveis de serem expostas a coccidiostáticos em condições práticas, através de quantidades residuais existentes nas rações para frangos de criação, para as quais os coccidiostáticos são licenciados até a idade de 14 ou 15 semanas. Este tipo de contaminação é até certo ponto inevitável, sendo que algumas regulamentações já definem inclusive LMR para normalizar estes casos onde compostos não autorizados para aves em postura, podem estar presentes em decorrência de contaminação cruzada na produção de rações. O controle dos níveis de contaminação é importante, tanto que de forma complementar, são realizadas análises de monitoramento em insumos e produtos destinados à alimentação animal para verificar a ocorrência de resíduos. Em princípio, a aplicação de coccidiostáticos para galinhas poedeiras, do ponto de vista clínico, não é essencial, considerando que nesta fase os animais já adquiriram imunidade (DORNE et al., 2013).

A produção intensiva de aves comerciais ao longo dos últimos 60 anos tem ocorrido em grande parte devido à introdução de coccidiostáticos (GUARDABASSI et al., 2010). Coccidiostáticos são utilizados no controle de infecções causadas por protozoários em diferentes espécies animais. Eles são mais amplamente utilizados como aditivos alimentares em espécies criadas intensivamente, tais como suínos e aves para manter a saúde dos animais e, em alguns casos, melhorar a conversão alimentar (CLARKE et al., 2014a). Em um primeiro momento - meados de 1950 - sulfonamidas foram utilizadas, sobretudo como coccidiostáticos, e elas ainda são registradas por

prescrição veterinária para terapia de coccidiose. Na década de 1980, um novo grupo de coccidiostáticos foi acrescentado: os ionóforos poliéteres (GUARDABASSI et al., 2010). Os ionóforos poliéteres são antibióticos produzidos naturalmente por espécies do gênero *Streptomyces* e a principal finalidade dos ionóforos é o controle da coccidiose. Sendo assim, os ionóforos foram e são usados quase que exclusivamente como coccidiostáticos na avicultura de corte, mas não são autorizados na avicultura de postura (GUARDABASSI et al., 2010). A monensina, salinomina e narasina são exemplos de antibióticos pertencentes ao grupo dos ionóforos. A monensina é recomendada para uso em frangos e perus de corte, desde que seja respeitado o período de carência de três dias antes do abate. A narasina e salinomina são recomendadas para o uso exclusivo em frangos de corte com período de carência de cinco dias (BLANCHFLOWER; KENNEDY, 1996). A coccidiose é uma infecção do trato intestinal por protozoários parasitas do filo *Apicomplexa*. Parasitas pertencentes ao gênero *Eimeria* podem ser predominantes em condições úmidas quentes que afetam as espécies de criação intensiva, tais como suínos, aves, bovinos, ovelhas e coelhos. Superlotação, más e insuficientes práticas de higiene para isolar animais infectados proporcionarão a proliferação da doença. Os parasitas são transmitidos através de oocistos, eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados e ingeridos por animais não infectados (SHARMAN et al., 2010). Uma vez ingeridos, esporozoítos são libertados a partir dos oocistos nas células epiteliais que revestem o intestino. Uma série de ciclos assexuados resulta no crescimento de merozoítos que se diferenciam em estágios sexuais. Macrogametas femininos são fertilizados pelos microgametas masculinos para produzir oocistos que são eliminados para, potencialmente, infectar outros animais, quando consumidos por estes. A doença pode levar a lesões intestinais, diarreia, baixo ganho de peso, baixa conversão alimentar e, em alguns casos, pode levar à morte (CHAPMAN, 2009; MOLONEY et al., 2012).

Mesmo pequenas lesões na parede intestinal devido à coccidiose podem afetar o crescimento do animal e diminuir a conversão alimentar, reduzindo a viabilidade econômica (MOLONEY et al., 2012). É considerado mais viável financeiramente administrar coccidiostáticos como aditivos alimentares para frangos de corte durante quase toda a sua vida (28-48 dias) em vez de tratar a coccidiose terapêuticamente

(CLARKE et al., 2014a). Em âmbito mundial, ionóforos ainda são sustentáculos da maioria dos programas para o controle de coccidiose. Além disso, esses agentes não são considerados antimicrobianos pela maioria das autoridades da saúde pública, uma vez que não são utilizados na medicina humana (GUARDABASSI et al., 2010).

As vacinas para prevenir a coccidiose (BARROW et al., 1990; ZHANG-BARBER; TURNER; BARROW, 1999; LI et al., 2004; DE ZOETE; VAN PUTTEN; WAGENAAR, 2007; HELDENS et al., 2008; SHARMAN et al., 2010), são um valioso instrumento de combate à perda de eficácia dos coccidiostáticos, e podem, em algumas situações, substituir os coccidiostáticos se os ionóforos forem proibidos como aditivos alimentares (GUARDABASSI et al., 2010). Atualmente, apesar da introdução de vacinas efetivas contra as principais cepas do agente causador da coccidiose, é possível identificar através dos dados de monitoramento do PNCRC do Brasil o uso ainda bastante amplo de compostos desta classe (BARRETO, 2014). O fato é que há provas circunstanciais de que enterites inespecíficas ocorrem com mais frequência em bandos imunizados com vacinas, em comparação aos bandos tratados com ionóforos coccidiostáticos, o que tem sido associado ao ciclo da vacina coccidial no intestino das aves. Por essa razão, o tratamento antimicrobiano específico pode ser necessário se a enterite tornar-se grave (GUARDABASSI et al., 2010).

A utilização de coccidiostáticos é uma questão ainda passível de debate (BARRETO, 2014). Novas medidas para mudar a legislação sobre a utilização de coccidiostáticos devem ser consideradas de forma cuidadosa, assim como sua remoção, que poderia ter implicações significativas para as indústrias avícolas do mundo (GUARDABASSI et al., 2010). Durante a proibição da utilização de aditivos e promotores de crescimento por parte da União Europeia, houve o correto entendimento de que alterar a regulamentação referente aos coccidiostáticos seria uma etapa crucial e requeria planejamento adequado (BARRETO, 2014). Alterações equivocadas de regulamentação poderiam inviabilizar a indústria avícola acarretando severos impactos econômicos.

B. Quinolonas

As quinolonas constituem um dos principais grupos de antibacterianos utilizados na medicina humana e veterinária para fins terapêuticos. Os medicamentos desse grupo pertencem à família dos inibidores da girase. Apresenta elevada eficácia contra bacilos entéricos gram-negativos, menor atividade contra bacilos não entéricos gram-negativos e estafilococos, e geralmente atividade relativa contra estreptococos e anaeróbios (ANDREU; BLASCO; PICÓ, 2007). Na medicina veterinária são amplamente utilizados no tratamento de várias infecções intestinais e respiratórias em animais domésticos e aves. As diversas aplicações e o tratamento intensivo de animais produtores de alimentos com quinolonas representam risco para a saúde humana; eles produzem resíduos nos produtos alimentares, causando reações alérgicas e aumento significativo na resistência antibacteriana em seres humanos (GAJDA et al., 2012; LOMBARDO-AGÜÍ et al., 2012). O amplo uso tem se mostrado alvo de grande preocupação quando cruzados com dados de resistência. Os Estados Unidos através do FDA e o Canadá através da agência Health Canada suspenderam a aprovação e a utilização de enrofloxacino em aves de corte após a identificação de aumento de isolados de *Campylobacter* resistentes a fluorquinolonas (FDA, 2005).

A maioria das quinolonas é excretada pela urina onde são encontradas inalteradas. No entanto, outras são biotransformadas (por exemplo, enrofloxacino que é biotransformado em outra quinolona, ciprofloxacino, por perda de um grupo etila). A análise dos resíduos do grupo das quinolonas em alimentos tem como resíduo marcador o composto inalterado (ANDREU; BLASCO; PICÓ, 2007).

As quinolonas foram descobertas em 1962 e, desde então têm sido objeto de inúmeras modificações no seu núcleo quinolina para melhorar o desempenho farmacocinético e espectro antimicrobiano (GALARINI et al., 2009).

As diferentes atividades *in vitro* das fluorquinolonas foram à base inicial da sua classificação, como se mostra na Tabela 1. A atividade antimicrobiana das quinolonas de primeira geração (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacino, ácido piromídico, ácido pipemídico, flumequina) foi excelente contra bactérias aeróbicas gram-negativas (ANDRIOLE, 2005), sendo que o ácido nalidíxico e o ácido oxolínico foram as quinolonas de primeira geração que mais foram usadas na clínica (GUARDABASSI et

al., 2010). As quinolonas de segunda geração incluem ciprofloxacino, norfloxacino, difloxacino, ofloxacino, levofloxacino, enoxacino, fleroxacino, lomefloxacino, pefloxacino e rufloxacino. E as fluorquinolonas mais recentes (isto é, as fluorquinolonas de terceira geração, incluindo grepafloxacino, gatifloxacino, esparfloxacino, temafloxacino, tosufloxacino e pazufloxacino) foram posteriormente desenvolvidas e possui maior eficácia contra bactérias gram-positivas, especialmente pneumococo; elas também apresentam boa atividade contra bactérias anaeróbias (ANDRIOLE, 2005). Estes fármacos mais recentes apresentam melhor atividade em relação à girase, maior penetração em microrganismos gram-positivos e farmacocinética e farmacodinâmica aprimoradas (GUARDABASSI et al., 2010).

Duas informações pertinentes são que a flumequina é registrada apenas em poucos países e, dentro da segunda geração de quinolonas, o enrofloxacino tem maior importância na medicina aviária. Por ser um produto intimamente relacionado ao ciprofloxacino que ainda é considerado como a alternativa de fármaco para muitas doenças bacterianas em humanos, esse agente antimicrobiano deve ser considerado como produto de última opção (produto de terceira escolha) em medicina aviária (GUARDABASSI et al., 2010).

Como já mencionado, as quinolonas são uma importante classe de antimicrobianos de grande relevância na produção. No Brasil, atualmente pelo menos sete compostos desta classe possuem registro para diferentes espécies. Especificamente na produção de aves, enrofloxacino é o composto com maior importância (BARRETO, 2014).

Tabela 1: Classificação dos antimicrobianos do grupo das quinolonas. Seguem alguns exemplos.

Primeira Geração	Segunda Geração	Terceira Geração ^b
Ácido oxolínico	Enrofloxacino	Esparfloxacino
Ácido nalidíxico	Norfloxacino	Gatifloxacino
Cinoxacino	Difloxacino	Grepafloxacino
Flumequina	Ciprofloxacino ^a	
Ácido piromídico	Lomefloxacino	
Ácido pepemídico	Ofloxacino	
	Levofloxacino	

^a Agente potente contra *Pseudomonas aeruginosa*.

^b Mais potentes contra *Streptococcus pneumoniae* e bactérias anaeróbicas, comparados com as gerações anteriores.

Fonte: (ANDRIOLE, 2005)

C. Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) representam um grupo de antimicrobianos sintéticos (FANG; HE; WANG, 2006) mais comumente usadas na medicina veterinária para o tratamento de uma variedade de infecções bacterianas (AGARWAL, 1992; GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2010). Apesar de terem sido frequentemente aplicadas como medicamentos humanos para tratar vários tipos de infecções, nos dias de hoje, quantidades muito mais elevadas são administrados para tratar e prevenir doenças infecciosas em animais e na agricultura (GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2010). Em animais produtores de alimentos, sulfonamidas foram utilizadas não só para fins terapêuticos, mas também para fins profiláticos (AGARWAL, 1992), principalmente para o controle da coccidiose, pulorose, tifo

aviário, cólera aviária e coriza infecciosa das galinhas (HAFEZ, 2003; KUENZEL et al., 2004) e como promotores de crescimento para prevenir e tratar uma série de doenças nos animais, tais como doenças infecciosas do trato respiratório e digestivo (FANG; HE; WANG, 2006). Pela legislação brasileira as SAs não são permitidas como aditivos. Quanto ao uso terapêutico em frangos de corte, deve-se respeitar o tempo de retirada de 5 dias antes do abate e em galinhas poedeiras o descarte de ovos nos 10 primeiros dias após o término do tratamento devido à presença de resíduos (BOOTH; MCDONALD, 1992; ZHENG et al., 2008; BARAN et al., 2011).

Em 1992, Booth e Mcdonald, descreveram a dificuldade de obterem dados oficiais disponíveis que fosse possível inferir que a sulfaquinoxalina (SQX) fosse à sulfa mais utilizada em avicultura industrial, por sua aplicação no controle da coccidiose, patologia de maior incidência nesta cultura. SQX também foi prescrita para auxiliar na redução de perdas por mortalidade decorrentes de infecções por *Pasteurella multocida*, *Salmonella gallinarum* e parafito na dose de 30mgkg⁻¹ ou a 0,1% na ração por dois a três dias e metade desta dose nos dois dias seguintes (BOOTH; MCDONALD, 1992). A ocorrência de antimicrobianos de diferentes classes (sulfonamidas, tetraciclina (TCs), fluorquinolonas e trimetoprima) em amostras de alimentação animal avaliada no período de 2012-2013, pelo LANAGRO-RS, apresentou incidência de resíduos antimicrobianos de, 7,8% SAs, 84% TCs e 3,79% TMP, respectivamente. A sulfaquinoxalina apresentou percentual de 2,6% (SOUSA et al., 2013).

Sulfonamidas são ativas contra amplo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo muitas espécies do gênero *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Nocardia*, *Chlamydia* e *Clostridium*. Além disso, sulfonamidas foram usadas contra protozoários (por exemplo, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium malariae*) e fungos (por exemplo, *Pneumocystis carinii pneumonia*) (BARAN et al., 2011).

As sulfonamidas possuem um limite muito estreito entre o seu efeito terapêutico e o tóxico e mesmos níveis terapêuticos podem causar efeitos deletérios sobre o sistema imune, hematopoiético e reprodutivo das aves. 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. A associação das sulfonamidas com as diaminopiridinas (trimetoprima e ormetoprima) reduz riscos de toxicidade porque se pode diminuir a dose da sulfa. As diaminopiridinas são pouco tóxicas, mas podem causar deficiência de ácido fólico e hipercalcemia quando utilizadas em doses muito elevadas (FURUSAWA; HANABUSA, 2002).

Sulfonamidas potencializadas (combinadas com trimetoprima) são muito mais adequadas para as mesmas indicações. Elas possuem atividade anticoccídea e não devem ser utilizadas nas primeiras três semanas após a vacinação contra coccidiose (GUARDABASSI et al., 2010). A associação diaminopirimidinas-sulfonamidas (trimetoprima e congêneres) tem sido aplicada para controle de infecções por *E.coli*, *Haemophilus paragallinarum*, cólera aviária (*Pasteurella multocida*) e salmoneloses (HAFEZ, 2003; KUENZEL et al., 2004).

Quanto ao uso terapêutico em frangos de corte, deve-se respeitar o tempo de retirada da sulfa cinco dias antes do abate e, em poedeiras, o descarte de ovos nos dez primeiros dias após o término do tratamento (BOOTH; MCDONALD, 1992).

3.3. Propriedades Físico-Químicas

A. Coccidiostáticos

Os coccidiostáticos podem ser classificados como de ocorrência natural - ionóforos poliéteres tais como monensina, narasina, lasalocida, salinomina e maduramicina - ou como coccidiostáticos sintéticos como halofuginona, robenidina, diclazuril e nicarbazina (DUBREIL-CHÉNEAU et al., 2009a). Os ionóforos são produzidos por 53 bactérias diferentes da família dos *Streptomycetaceae*. Eles são caracterizados por múltiplos anéis tetraidrofurano ligados entre si sob a forma de porções de espirocetal (RIDDELL, 2002) tal como mostrado na Figura 3. Os coccidiostáticos sintéticos (Fig. 4) podem ser subdivididos em derivados de quinolonas, piridona, alcalóides, guanidinas, analógicos, tiaminas e derivados triazinas (CLARKE et al., 2014a).

Derivados da guanidina tais como robenidina possuem uma ligação imina central contendo uma ligação dupla carbono-nitrogênio (ligação azo), com o átomo de nitrogênio ligado a um átomo de hidrogênio ou um grupo orgânico. Derivados de triazina podem ser divididos em dois subgrupos: triazinas assimétricas (1,2,4) e triazinas simétricas (1,3,5). Ambos os subgrupos contêm um anel heterocíclico, que é análogo ao anel de seis carbonos, benzeno, mas com três átomos de carbono substituídos por átomos de nitrogênio. O amprólio é um análogo de tiamina (vitamina B1) em termos de estrutura. No entanto, ele não tem a funcionalidade hidroxil-etil que a tiamina possui e, portanto, não é fosforilado para ser um análogo de pirofosfato (CLARKE et al., 2014a).

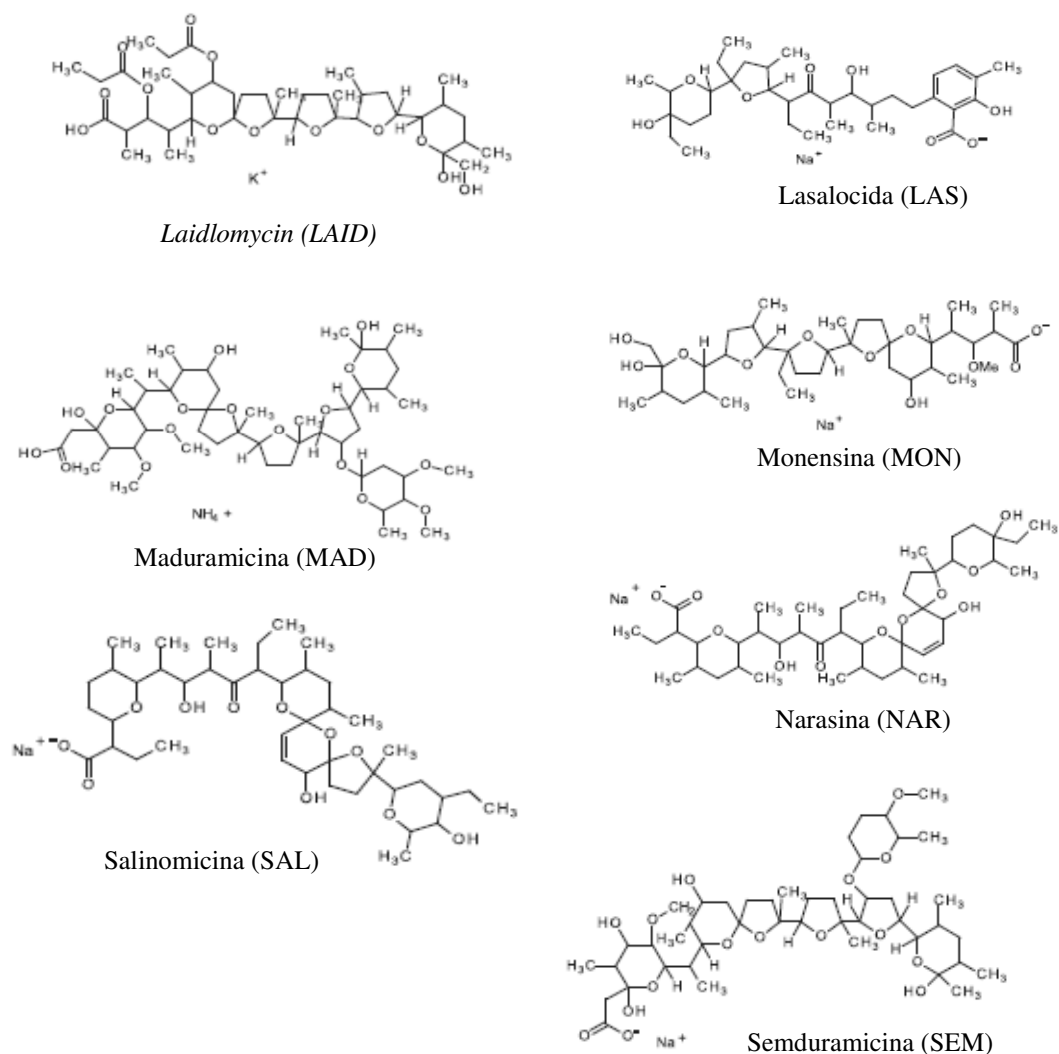


Figura 3: Estruturas moleculares dos ionóforos naturais.

Fonte: (RIDDELL, 2002)

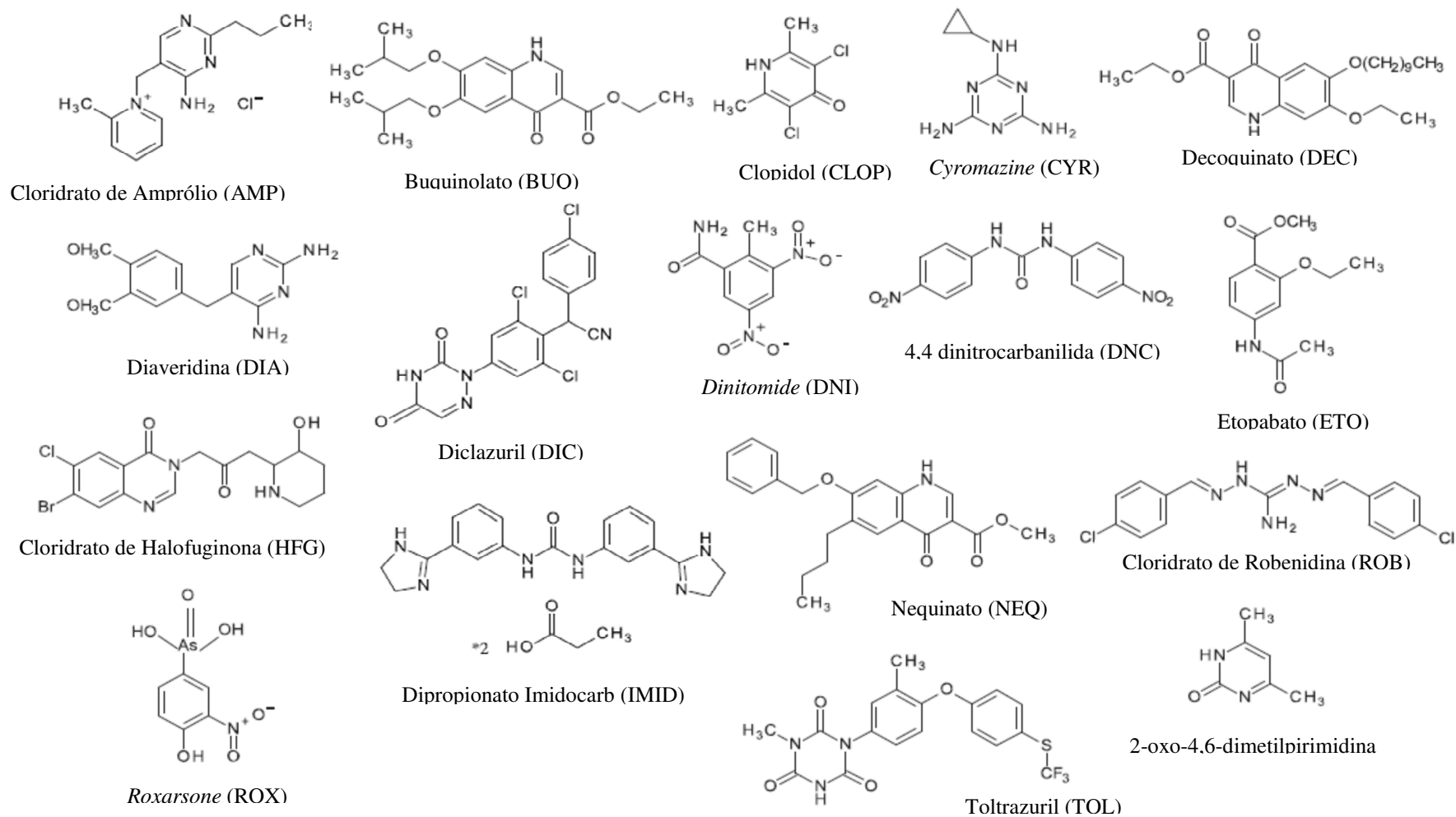


Figura 4: Estruturas moleculares dos coccidiostáticos sintéticos.

Fonte: (CLARKE et al., 2014b)

B. Quinolonas

As quinolonas são substâncias sintéticas desenvolvidas a partir de algumas modificações estruturais da estrutura molecular principal 4-oxo-1,4-quinolona ou simplesmente 4-quinolona que consiste em um anel bicíclico como estrutura central (Fig.5) (SARRO; SARRO, 2001; CROSS JR, 2001). Os atuais antimicrobianos dessa classe têm um grupo carboxila (-CO₂H) na posição 3, um grupo carbonila (-C=O) na posição 4, um átomo de flúor (F) na posição 6, e um grupo piperazinil (exemplo, norfloxacino – Fig.6) ou um grupo metil piperazinil (exemplo, difloxacino - Fig.6) na posição 7. A presença de diferentes grupos ligantes ao átomo de nitrogênio (N) ou na posição 7 influencia acentuadamente as propriedades microbiológicas e farmacocinéticas desses antimicrobianos (SARRO; SARRO, 2001). As estruturas moleculares de alguns desses compostos de maior uso na medicina aviária e alvo de métodos de monitoriamento de resíduos, estão representados na Figura 6 (ANDREU; BLASCO; PICÓ, 2007; GAJDA et al., 2012; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

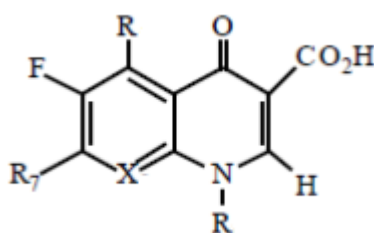


Figura 5: Estrutura molecular principal das quinolonas.

Fonte: (SARRO; SARRO, 2001; CROSS JR, 2001)

As alterações mais marcantes na estrutura principal das quinolonas são a introdução do átomo de flúor (F) na posição 6 e um anel substituinte de piperazina ou metil-piperazina na posição 7. Devido à inclusão do átomo F, as quinolonas são frequentemente denominadas "fluorquinolonas"(CROSS JR, 2001; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014). E a adição de piperazina ou metil-piperazina na posição 7 marca o aumento da atividade bacteriana de uma nova geração de antibacterianos da classe das fluorquinolonas (NAEEM et al., 2016).

As fluorquinolonas como uma classe geral são relativamente insolúveis em água. Os compostos de quinolona apresentam caráter de íon dipolar (*zwitteriônico*)

devido à presença de um ácido carboxílico e uma amina básica; os valores de pKa para os grupos funcionais têm sido relatados como 5,5-6,3 para o ácido carboxílico e 7,6-9,3 para o grupo amino distal. As quinolonas são mais solúveis em água a pH ácido e básico, com menor solubilidade para valores de pH fisiológico. O empacotamento cristalino de quinolonas em que os núcleos aromáticos são empilhados, também contribui para diminuir a solubilidade aquosa e resulta em pontos muito elevados de fusão maior do que 200°C (CROSS JR, 2001).

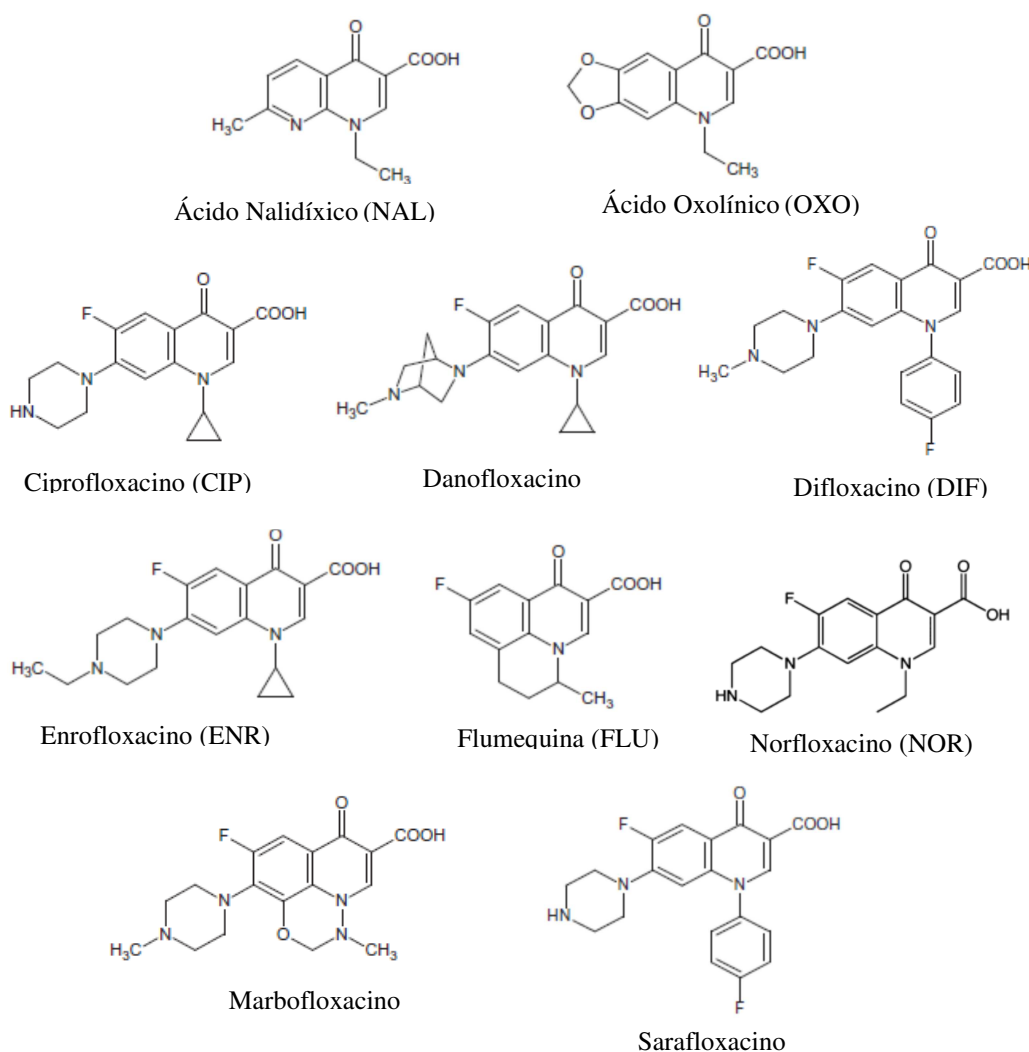


Figura 6: Estruturas moleculares de alguns antimicrobianos da classe das quinolonas e fluorquinolonas.

Fonte: (ANDREU; BLASCO; PICÓ, 2007; GAJDA et al., 2012; ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

C. Sulfonamidas

As sulfonamidas compreendem um grande número de compostos antimicrobianos sintéticos. Todos eles contêm a estrutura comum de uma amina *n* substituída em um anel benzênico e um grupo sulfonamida em posição *para* em relação à amina (AGARWAL, 1992; SHAO et al., 2005; WON et al., 2011). As estruturas moleculares estão apresentadas na Figura 7 e correspondem aos agentes antimicrobianos sintéticos que contêm o grupo sulfonamida, caracterizado por um grupo amino livre (-NH₂) em uma das extremidades (SHAO et al., 2005; SUKUL; SPITELLER, 2006; BARAN et al., 2011). Os compostos desse grupo apresentam diferentes propriedades físico-químicas, devido aos diferentes grupos ligantes laterais (SUKUL; SPITELLER, 2006).

As sulfonamidas não são solúveis em água (com a exceção da sulfaguanidina e da sulfacetamida) (SUKUL; SPITELLER, 2006; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; BARAN et al., 2011), sendo compostos polares que ionizam dependendo do pH do meio (SUKUL; SPITELLER, 2006). Em geral, as sulfonamidas contêm grupos funcionais polares em um núcleo não polar e, portanto, apresentam propriedades anfóteras. Sulfonamidas geralmente possuem dois pKa, os valores são resultantes (a) da protonação do grupo amino a em pH de 2-3 e (b) da desprotonação em pH 5-11 do nitrogênio da amida (INGERSLEV; HALLING-SØRENSEN, 2000; QIAN et al., 2016). A atividade antibacteriana de sulfonamidas é muito reduzida quando o nitrogênio de amino está substituído (THIELE-BRUHN, 2003). Elas competem com ácido p-aminobenzóico na síntese enzimática de ácido diidrofólico e assim inibem o crescimento e a reprodução de bactérias (YANG; CHA; CARLSON, 2004). Os valores do coeficiente de partição, Log K, para vários compostos de sulfonamidas são entre -0,1 e 1,7, sugerindo que não são intensivamente hidrofóbicos (SUKUL; SPITELLER, 2006).

Elas são classificadas como substâncias foto e termicamente estáveis com meia-vida superior a um ano (BARAN et al., 2011). As sulfonamidas podem sofrer reações de hidrólise alcalina e acoplamento com fenóis e aminas e facilmente reagir com o radical hidroxila HO• (BOREEN; ARNOLD; MCNEILL, 2004; SUKUL;

SPITELLER, 2006; GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2010).

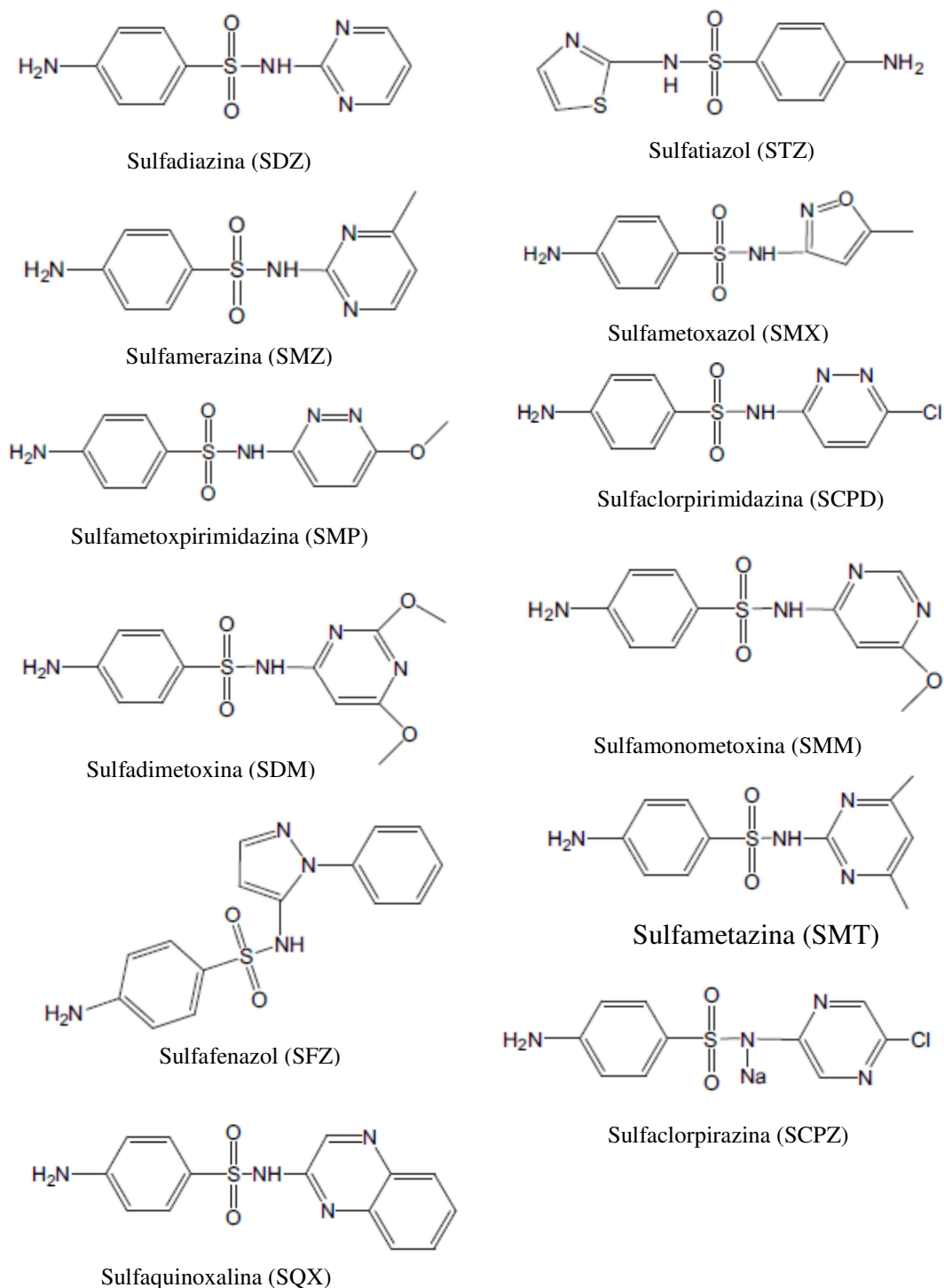


Figura 7: Estruturas moleculares de algumas sulfonamidas.

Fonte: (SUKUL; SPITELLER, 2006).

3.4. Metodologias Analíticas Aplicadas no Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários

Este item irá se concentrar nas metodologias que foram publicadas na análise de medicamentos veterinários, principalmente, em ovos de galinha poedeira no período de 1992 a 2016. Esse levantamento encontra-se na Tabela 4 (Apêndice).

As classes individuais de agentes antimicrobianos em ovos são determinadas com técnicas de imunoensaio (HAGREN et al., 2006; HUET et al., 2006; WANG et al., 2007) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detectores de fluorescência (DF) ou ultravioleta (UV) (AGARWAL, 1992; DRAISCI et al., 1995; HELLER; NOCHETTO, 2004; DOWLING; O'KEEFFE; SMYTH, 2005; FANG; HE; WANG, 2006; NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008; KIM et al., 2010; GAJDA et al., 2012; HUERTAS-PÉREZ et al., 2016; HE et al., 2016). Vários métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) foram também relatados (BLANCHFLOWER; KENNEDY, 1996; TARBIN; CLARKE; SHEARER, 1999; GENTILI; PERRET; MARCHESE, 2005; STOLKER et al., 2007; BOGIALLI; DI CORCIA, 2009; BOGIALLI et al., 2009b, 2009a; FORTI; SCORTICHINI, 2009; KINSELLA et al., 2009).

Ensaio microbiológicos estão entre as técnicas mais comumente utilizadas para a detecção da maioria das classes de antibióticos. No entanto, devido às taxas de falsos positivos serem altas e também a incapacidade de detecção dos antibióticos de determinadas classes em concentrações cada vez mais baixas, somados a obrigatoriedade de um ensaio para confirmação, que permita a detecção seletiva, sensível, rápida e precisa quantificação dos antibióticos, tiveram seu uso limitado (BOSCHER et al., 2010).

Os detectores de arranjo de diodos (DAD) permitem que a absorvância de uma amostra em todos os comprimentos de onda seja determinada de modo simultâneo. A resolução espectral depende do tipo e do número de diodos que compõe o arranjo. A limitação consiste na detecção somente de compostos que absorvem na região UV-Visível. Detectores de fluorescência (DF) baseiam-se na medida da luz emitida pelas substâncias previamente irradiadas com luz UV. Uma das características mais

relevantes da fluorescência molecular está na sua sensibilidade intrínseca, a qual freqüentemente é de uma a três vezes maiores que a da espectroscopia de absorção. De fato, para determinadas espécies sob condições controladas, a presença de uma única molécula pode ser determinada pela espectroscopia de fluorescência. Outra vantagem está na faixa linear de concentração dos métodos de fluorescência, a qual é significativamente maior que aquela encontrada na espectroscopia de absorção. Contudo, os métodos de fluorescência são muito menos aplicados que os métodos de absorção em razão do número limitado de sistemas químicos que fluorescem com intensidade apreciável. A fluorescência está também sujeita a muitos outros efeitos de interferência ambiental que os métodos de absorção (SKOOG et al., 2006).

O Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (MAPA, 2015) traz os critérios a serem atendidos para a quantificação e confirmação resíduos de MVs sendo baseado na decisão da Comissão Européia 2002/657/EC. Para que seja possível atender os pontos de identificação necessários tanto para compostos permitidos quanto banidos, o uso de ferramentas de cromatografia hifenadas à espectrometria de massas tem se tornado universal. Para detectores menos específicos, além de não ser possível a confirmação de compostos banidos (Grupo A, 96/23/EC), é necessário realizar etapas adicionais para confirmação, como o uso de uma segunda condição cromatográfica. A CL-EM/EM quando operada no modo de monitorização de reação múltipla (MRM), utiliza um íon precursor e dois íons dos produtos (fragmentos), satisfazendo o requisito de identificação (BOSCHER et al., 2010). Nos últimos anos, existe uma tendência crescente para desenvolver métodos CL-EM/EM para uma classe ou mais classes de antimicrobianos (antibióticos, antiparasitários e outros) (MATABUDUL et al., 2001; HELLER et al., 2002; YAKKUNDI et al., 2002; MORTIER; DAESELEIRE; DELAHAUT, 2003; HELLER; NOCHETTO, 2004; MORTIER; DAESELEIRE; PETEGHEM, 2005; MULDER et al., 2005; ROKKA; PELTONEN, 2006; HELLER et al., 2006; CUI et al., 2006; HAMSCHER et al., 2006; HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007; PIKKEMAAT et al., 2007; WANG; LEUNG, 2007; NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008; BOGIALLI; DI CORCIA, 2009; SHAO et al., 2009; BOGIALLI et al., 2009b; FORTI; SCORTICHINI, 2009; DUBREIL-CHÉNEAU et al., 2009a; PETERS et al., 2009; ROCHA SIQUEIRA et al.,

2009; GARRIDO FRENICH et al., 2010; KIM et al., 2010; SPISSO et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2011; GALARINI et al., 2011; DENG et al., 2011; BŁADEK et al., 2012; GAJDA et al., 2012; CAPRIOTTI et al., 2012; DUBREIL-CHÉNEAU et al., 2014; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; PREMARATHNE et al., 2015; CHEN et al., 2016; PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016; RIBEIRO et al., 2016; HUERTAS-PÉREZ et al., 2016; HE et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Diversos trabalhos recentemente publicados relatam a determinação simultânea de distintas classes de antimicrobianos, como por exemplo: ionóforos e macrolídeos (MCs) (HELLER; NOCHETTO, 2004); sulfonamidas (SAs), tetraciclinas (TCs), FQs, β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) (HELLER et al., 2006); coccidiostáticos e ionóforos (SHAO et al., 2009; DUBREIL-CHÉNEAU et al., 2009b; GALARINI et al., 2011); benzimidazóis, MCs, penicilinas, FQs, SAs, TCs, nitroimidazóis, coccidiostáticos, ionóforos e anfenicóis (PETERS et al., 2009); tetraciclinas, flurquinolonas (FQs), macrolídeos, sulfonamidas, avermectinas e benzimidazóis (GARRIDO FRENICH et al., 2010); ionóforos poliéter, MCs e lincosamidas (SPISSO et al., 2010); 105 resíduos de fármacos, incluindo benzimidazóis, nitroimidazóis, FQs, SAs, TCs (DENG et al., 2011); SAs, FQs, MCs, penicilinas, lincosamidas e derivados diaminopiridinas (trimetoprima) (JIMÉNEZ et al., 2011); β -lactâmicos, MCs, TCs, FQs, SAs e lincosamidas (BŁADEK et al., 2012); TCs, ionóforos, coccidiostáticos, penicilinas, cefalosporinas, FQs, SAs e micotoxinas (CAPRIOTTI et al., 2012); 115 substâncias químicas de uso veterinário das classes de FQs, TCs, cefalosporinas, penicilinas, MCs, SAs, benzimidazóis, nitroimidazóis, coccidiostáticos, antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), anfenicóis, anti-helmintícos, β -agonistas e β -bloqueadores, esteroides, analgésicos, diuréticos e outros (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015); FQs, MCs, β -lactâmicos, nitroimidazóis, SAs, lincomicina, cloranfenicóis, quinoxalinas, TCs, polipeptídeos e antimicrobianos sinérgicos (CHEN et al., 2016); e, TCs, FQs, SAs, nitroimidazóis, anfenicóis, cefalosporinas, coccidiostáticos, macrolídeos, penicilinas, benzimidazóis, inseticidas, corantes, lincosamida, pleuromutilina, quimioterápicos e aminoglicosídeos (PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016).

Conforme a Tabela 4 (Apêndice) é possível notar que durante os anos 2000, a CL-EM/EM tornou-se essencial na rotina de análises laboratoriais para produtos de origem animal (HELLER et al., 2002). A CL-EM/EM é uma técnica que apresenta alta seletividade, especificidade e sensibilidade com diversas aplicações (SHAO et al., 2005). A ionização por *electrospray* produz íons à pressão atmosférica e à temperatura relativamente baixa, o que minimiza a decomposição térmica de compostos lábeis (FUH; CHAN, 2001). A maioria dos MVs pode ser facilmente detectada por CL-EM com ionização *electrospray* (ESI), enquanto a espectrometria de massas em *tandem* (EM-EM) fornece a alta especificidade necessária para analitos alvo em matrizes complexas (HELLER et al., 2002). Nos últimos anos, portanto, um grande esforço tem sido observado para desenvolver metodologias de CL-EM/EM, incluindo multiclasse de fármacos veterinários para realizar triagens confirmatórias ou métodos quantitativos confirmatórios (MORETTI et al., 2016).

Neste contexto os protocolos de preparação de amostras, se apresentam genéricos objetivando a extração de um número grande de analito. Inevitavelmente, ocorre co-extração, grande número de substâncias interferentes (proteínas e compostos indesejáveis) da matriz também são extraídas (BOSCHER et al., 2010; BERENDSEN et al., 2013). Como consequência, significativos efeitos de matriz (principalmente de supressão de íons) são observados devido à falta de especificidade na etapa de extração das amostras (BOSCHER et al., 2010; FREITAS; BARBOSA; RAMOS, 2015). O tratamento da amostra é um passo importante para alcançar simultaneamente uma extração eficiente e um extrato *limpo* (com o mínimo de interferentes) para diferentes classes de compostos a partir de matrizes complexas (ZHANG et al., 2016). Os diferentes grupos de substâncias químicas, as propriedades anfotéricas de muitos compostos, e a grande variedade de polaridades apresentam dificuldades para a extração, limpeza e separação analítica (BOSCHER et al., 2010).

Diferentes técnicas de extração são disponíveis para a análise de resíduos de MVs. Entre as mais difundidas estão à extração em fase sólida. Atualmente, as abordagens mais frequentes aplicam a técnica QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap*,

Effective, Rugged and Safe) a qual tem demonstrado bom resultados para métodos multirresíduos (YU et al., 2011).

4. DISCUSSÃO GERAL

Para a realização do desenvolvimento da metodologia analítica consolidada nesse trabalho foram executadas em três grandes etapas:

- I. Método de análise por CLAE-EM/EM;
- II. Otimização do protocolo de extração, purificação e concentração dos resíduos de medicamentos veterinários;
- III. Método de validação de acordo com a Diretiva da Comissão Européia 2002/657/CE.

Os resultados finais estão presentes no artigo (item 6. Artigo) atendendo os critérios mínimos de desempenho para métodos de análise de resíduos, de medicamentos de uso veterinário, em alimentos de origem animal destinados ao consumo humano estabelecidos na Diretiva da Comissão Européia 2002/657/CE.

O método de validação desenvolvido trata-se de um método de validação de extensão de escopo com inclusão de analitos em ovo. Esta abordagem usualmente não é discutida nos manuais de validação, por exemplo, na Diretiva da Comissão Européia 2002/657/CE. A validação de extensão de escopo é uma necessidade na rotina de laboratórios que desenvolvem atividades analíticas e aplicada pela rede de Laboratório Nacional Agropecuário do MAPA como discutido por Hoff, R.B. et al. (HOFF et al., 2015).

Anteriormente a metodologia desenvolvida, as análises de antimicrobianos (sulfonamidas e quinolonas) e coccidiostáticos em ovos, eram realizadas por três metodologias distintas, pelo LANAGRO-RS. As três metodologias utilizadas para o controle de resíduos de MVs em ovos acabavam por utilizar de forma exacerbada a capacidade operacional do laboratório reduzindo significativamente a possibilidade de ampliação de escopo e atendimento de novas demandas.

Ressalta-se, que no LANAGRO/RS, era usual a recepção de uma amostra para cada uma das metodologias (sulfonamidas, quinolonas e coccidiostáticos) distintas para análise de ovos. A Tabela 2 apresenta a comparação entre a lista dos medicamentos veterinários monitorados por metodologias distintas, conforme a

Instrução Normativa do MAPA N°11 (IN 11 MAPA, 2014), e a junção das três classes com a inclusão dos novos compostos (**negrito**) na metodologia analítica desenvolvida e consolidada neste trabalho. Desta forma, é imprescindível pontuar a inovação apresentada pela consolidação de diferentes classes em um procedimento único com a possibilidade de monitoramento de um número superior de compostos relevantes na produção comercial de ovos.

Complementarmente agrega significado ao trabalho, o fato de a metodologia desenvolvida ser aplicada a análises oficiais, permitindo a ampliação das garantias à segurança dos consumidores. Além do aspecto relacionado ao controle de alimentos no âmbito do mercado interno, a ampliação do escopo de analitos propiciado por este trabalho permitiu o pleito de equivalência com sistemas de controle de outros países para a matriz ovo vislumbrando a possibilidade de exportação destes produtos agregando valor aos produtos de origem animal brasileiros.

Tabela 2: Comparação da lista de compostos monitorados conforme IN N°11 MAPA e os compostos incluídos na metodologia analítica desenvolvida nesse trabalho.

Classes	Compostos conforme a IN N° 11 MAPA de 2014	Compostos monitorados com a metodologia nova
Sulfonamidas	Sulfatiazol Sulfametazina Sulfadiazina Sulfaquinoxalina Sulfametoxazol Sulfadimetoxina	Sulfatiazol Sulfametazina Sulfadiazina Sulfaquinoxalina Sulfametoxazol Sulfadimetoxina Sulfadoxina Sulfaclopiridazina Sulfamerazina
Quinolonas	Enrofloxacino Ciprofloxacino	Enrofloxacino Ciprofloxacino Flumequina Danofloxacino Ácido Oxolínico Ácido Nalidixico Sarafloxacino Difloxacino Norfloxacino
Coccidiostáticos	Lasalocida Monensina Clopidol Semduramicina Trimetoprim Salinomicina Diaveridina Toltrazuril Robenidina Amprólio Narasina Diclazuril Maduramicina	Lasalocida Monensina Clopidol Semduramicina Trimetoprim Salinomicina Diaveridina Toltrazuril Robenidina Amprólio Narasina Diclazuril Maduramicina Etopobato Decoquinato Nicarbazina

Inclusão desses compostos na metodologia nova.

**5. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA EM AMOSTRAS
DO PNCRC 2015/2016**

A metodologia multirresíduo multiclasse desenvolvida e validada foi aplicada na análise de 391 amostras do PNCRC de Julho/2015 a Dezembro/2016. Das 391 amostras monitoradas 103 foram quantificadas para pelo menos um dos antimicrobianos em estudo neste trabalho. A Figura 8 apresenta a ocorrência de contaminação em ovos com medicamentos veterinários, sendo que nesse período os antimicrobianos que apresentaram maior incidência em ovos foram o enrofloxacino (41%), DNC (22%), ciprofloxacino (6%), trimetoprima (6%) e sulfametazina (6%).

Ocorrência de Contaminação em Ovos com Antimicrobianos Julho/2015 à Dezembro/2016

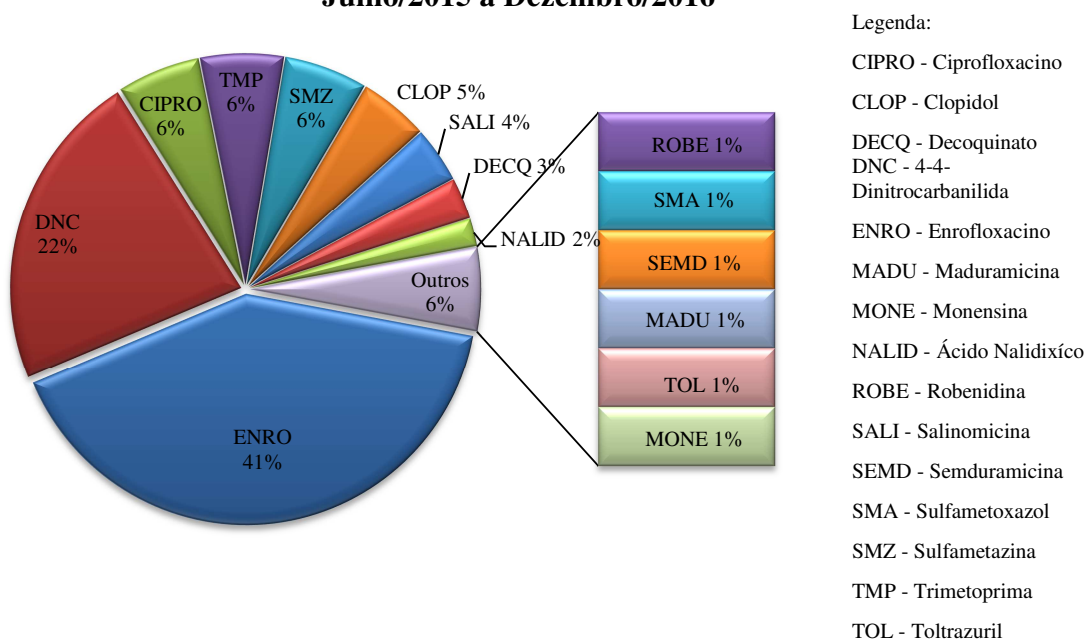


Figura 8: Ocorrência de contaminação em ovos com antimicrobianos no período de Julho/2015 à Dezembro/2016.

E treze (13) amostras foram quantificadas com valores acima de $20\mu\text{gkg}^{-1}$, sendo que, ENRO(5): $721,33\mu\text{gkg}^{-1}$, $115,2\mu\text{gkg}^{-1}$, $100,5\mu\text{gkg}^{-1}$, $136,0\mu\text{gkg}^{-1}$ e $144,33\mu\text{gkg}^{-1}$; DNC (3): $73,33\mu\text{gkg}^{-1}$, $53,7\mu\text{gkg}^{-1}$ e $52,27\mu\text{gkg}^{-1}$; TMP(3): $137,33\mu\text{gkg}^{-1}$, $127,07\mu\text{gkg}^{-1}$ e $151,33\mu\text{gkg}^{-1}$; CIPRO(1): $268,5\mu\text{gkg}^{-1}$ e SMZ(1): $84,03\mu\text{gkg}^{-1}$.

Para quinze amostras foram encontradas contaminações com mais de um antimicrobiano e de classes distintas como ilustrado na Figura 9. Sendo que destas, quatro amostras reais (A10, A11, A12 e A14) foram quantificadas sulfametazina e trimetoprima. Em quatro amostras (A1, A2, A3 e A15) foi encontrada contaminação

quantificável de enrofloxacino e ciprofloxacino. A amostra 15, não consta na Figura 9, apresentou valor extremamente alto para o enrofloxacino igual à 721,3µg/kg e 16,4µg/kg para ciprofloxacino. Em sete amostras (A4, A5, A6, A7,A8, A9 e A13) encontrou-se nicarbazina e enrofloxacino. Foram quantificados, nas amostras A13 e A14, três antimicrobianos. Para a amostra A13, apresentou enrofloxacino, semduramicina e DNC. E, a amostra A14: DNC, sulfametazina e trimetroprima.

**Ocorrência de Mais de Um Antimicrobianos em Ovos
Julho/2015 à Dezembro/2016**

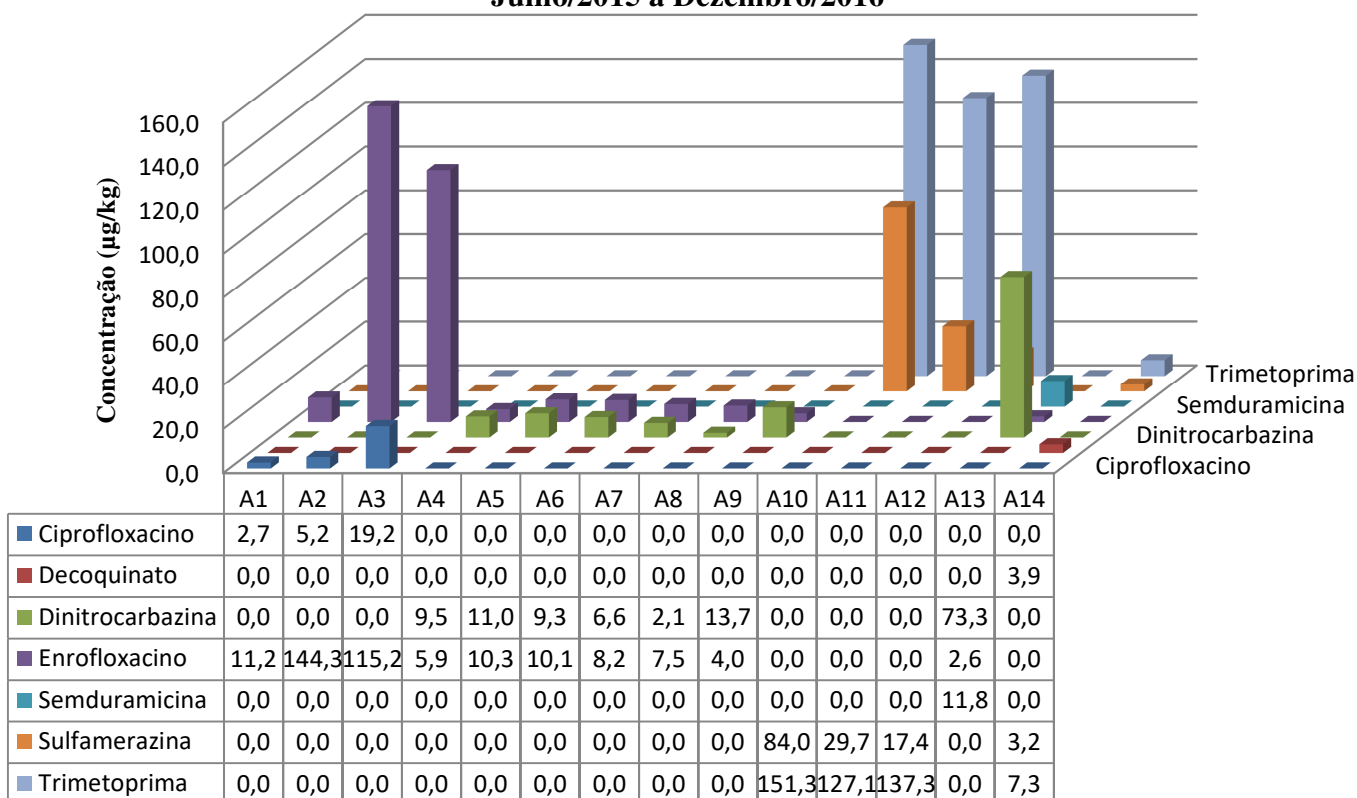


Figura 9: Ocorrência de mais de um antimicrobiano quantificado em ovos.

A avaliação desses dados nos permite obter o panorama do uso concomitante de mais de um antimicrobiano e de diferentes classes na produção de ovos de galinhas poedeiras, comprovando a necessidade do desenvolvimento de metodologias multirresíduos multiclases para o monitoramento de resíduos contaminantes em ovos e outros produtos de origem animal.

Nossos dados permite realizar uma análise paralela com o relatório emitido pelo Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR) (MACHINSKI JUNIOR et al., 2005), no qual, observaram o uso de medicamentos veterinários não recomendados para aves,

inclusive para poedeiras. Com aplicação de questionários em granjas do estado do Paraná.

Realizado a comparação entre os medicamentos de uso veterinário de maior ocorrência no período de Julho/2015 à Dezembro/2016 com os produtos comerciais disponibilizados pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde (SIDAN) do Compêndio de Produtos Veterinários (<http://www.cpvs.com.br>), apresentados na Tabela 2. O enrofloxacino foi o antimicrobiano de maior ocorrência (41%) e possui maior quantidade de produtos comerciais disponíveis (14) para o uso. A sulfametazina e trimetoprima, apresentaram o mesmo percentual de ocorrência (6%, Fig 8.) nas amostras reais analisadas (A10, A11, A12 e A14, Fig. 9) e é possível fazer uma relação interessante com as formulações disponíveis nos produtos comerciais levantados (Tabela 2), onde esses dois princípios ativos encontram presentes de forma associada em quatro produtos comerciais. No caso do ciprofloxacino, apesar de existir dois produtos comerciais de formulação de um único princípio ativo (ciprofloxacino) não é possível fazer a correlação da formulação com ocorrência em ovos. A presença de ciprofloxacino em ovos pode está correlacionada com a metabolização do enrofloxacino em ciprofloxacino, notável presença nas amostras A1, A2 e A3 (Fig. 9). Já, a ausência do ciprofloxacino nas amostras quantificadas para enrofloxacino (A4 a A9 e A13, Fig.9) pode está relacionada com o período de carência e o período da colheita do ovo, ou seja, com o período de carência maior para a colheita do ovo possivelmente foi o tempo necessário para que a concentração plasmática de ciprofloxacino estivesse em níveis reduzidos, com conseqüente menor acumulação no ovo, acarretando na não quantificação do mesmo para essas amostras. Diferentemente para as amostras A1, A2 e A3 (Fig.9), provavelmente o período de administração do antimicrobiano e o período da colheita foi menor, sendo possível correlacionar com metabolização do enrofloxacino em ciprofloxacino.

Tabela 3: Lista de produtos comerciais disponibilizados no SIDAN de uso em aves.

Princípios Ativos	Associado (A) ou Não Associado (NA)	Via de Administração	Quantidade de Produtos
Enrofloxacino	NA	Via oral: diluir ou dissolver em água de bebida.	14
Sulfametazina	Clortetraciclina e Trimetoprima*; Sulfaquinoxal; Trimetoprima e Corante (azul de metileno)*; Doxiciclina e Trimetoprima*; Trimetoprima*; Sulfaquinoxal e Bacitracina.	Via oral: diluir em água de bebida ou misturado à ração.	6
Trimetoprima	Clortetraciclina e Sulfametazina*; Sulfametazina e Corante (azul de metileno)*; Doxiciclina e Sulfametazina*; Sulfametazina*.	Via oral: diluir em água de bebida ou misturado à ração.	4
Nicarbazina	Narasina	Via oral: misturado à ração.	1 (A) e 3 (NA)
Salinomicina	NA	Via oral: misturado à ração	2
Ciprofloxacino	NA	Via oral: dissolvido em água de bebida ou misturado à ração.	2

*São os mesmos produtos comerciais.

6. ARTIGO

Determination of multiresidues of veterinary drugs (coccidiostats, quinolones and sulfonamides) in laying hen eggs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry in *Tandem* (LC-MS/MS)

Diana Alves de Sousa^a, Fabiano Barreto^b, Ana Maria Bergold^a

^a*Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;* ^b*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Abstract

A multiclass, multiresidue method for the simultaneous quantitative determination of 35 veterinary drugs in eggs using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. The method covers the analytes belonging to coccidiostats (17), quinolones (9) and sulfonamides (9) classes. Samples were extracted using 0.1% formic acid in acetonitrile with low temperature purification step (LTP). The chromatographic separation was achieved on C18 column using a mobile phase consisting of (A) 0.1% formic acid in 1mmol/L ammonium formate aqueous and (B) 0.1% formic acid in 1mmol/L ammonium formate in acetonitrile, using a gradient mode. Validated results according to the requirements of European Commission Decision 2002/657/EC are as follows: linearity ($r^2 \geq 0.95$), overall recovery between 30.63% and 63.44%, coefficient of variation for repeatability ranging from 3.21% to 18.69%. Method precision led to satisfactory values of decision limits ($CC\alpha$) and veracity for all the analytes. The presented method was applied for the analysis of 391 real egg samples obtained from the official monitoring control program in the period from July 2015 to December 2016.

Keywords: coccidiostats; quinolones; sulfonamides; eggs; LC-MS/MS; Low Temperature Purification.

1. Introduction

Eggs are one of the most important foods in many countries. They are not expensive, are commonly available and are used as an ingredient to produce many other foods. (KOVACS-NOLAN; PHILLIPS; MINE, 2005).

Several veterinary drugs such as coccidiostats, quinolones, and sulfonamides are usually administered to poultry through feed or drinking water, for the prevention and treatment of infectious diseases in laying hens (FURUSAWA, 2001; RIBEIRO et al., 2016). In intensive poultry farming with limited area, infectious diseases can spread very quickly. These veterinary drugs can be absorbed by the digestive tract of laying hens and transferred to the egg. After administration, if withdrawal time is not applied, there is a risk of residues persistence above of the maximum residue levels established (TEWARI; MAHARANA, 2011). (FURUSAWA, 2001; RIBEIRO et al., 2016). Physicochemical characteristics of these compounds determine their pharmacokinetic behavior, distribution and accumulation on eggs (KAN; PETZ, 2000). To ensure the compliance of food safety requirements, the assessment of residue levels of veterinary drugs used in production is essential, as well as the compliance with the maximum residue levels (MRLs) established. In order to ensure consumers protection, different regulations are applied by different regulatory authorities for risk management of veterinary drugs residues in food. In order to adequately control and mitigate the risks to consumers, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) through the National Residue Control Plan (NRPC) maintains a monitoring program covering a wide list of compounds, aiming to obtain information that will supports decision making. The regulatory action levels established by Brazilian Authorithies are in line with the main international regulations. The maximum residue limits, maximum levels (ML) and minimum required performance level (MRPL) for veterinary medicinal products are listed in regulatory documents and guidelines such as Commission Regulation 37/2010 (EUROPEAN COMMISSION, 2010). Antimicrobials could be also used for weight gain purposes, because of their anabolic effect. As any other pharmaceutical, the misuse of antimicrobial products may lead to negative effects on animal and human

health. They might be carcinogenic, genotoxic, immunotoxic, (SØRUM; L'ABÉE-LUND, 2002; TEWARI; MAHARANA, 2011; LIU et al., 2011; ROBERT et al., 2013) and the indiscriminate use of these classes of products may lead to favorable conditions to the development of high bacterial resistance levels (FRY; WILLIAMS, 1984; JACOBS-REITSMA; KAN; BOLDER, 1994; MARK WEBBER; LAURA J.V. PIDDOCK, 2001; BARAN et al., 2011).

The occurrence of unavoidable carry-over of feed additives in the production of additive-free feed may result in the presence of residues of coccidiostats and antibiotics in animal products such as meat and eggs. Recently, the European Commission has set maximum levels (MLs) for eleven coccidiostats in various foods originated from non-target animals (EUROPEAN COMMISSION, 2009). The substances under this regulation scope are six ionophore antibiotics (lasalocid (LASA), maduramycin (MADU), monensin (MONE), narasin (NARA), salinomycin (SALI) semduramicin (SEMD)) and five chemical coccidiostats (decoquinate (DECQ), diclazuril (DICLA), halofuginone (HALO), nicarbazin (DNC) and robenidine (ROBE)). Only for lasalocid and monensin a MRL were established in poultry and bovine, respectively (EUROPEAN COMMISSION, 2010). The permitted limits (PLs) for listed anticoccidials substances in eggs are: $2\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for DICLA, NARA, MADU, MONE and SEMD; $3\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ SALI; $6\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ HALO; $20\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DECQ; $25\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ROBE; $300\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ DNC and $150\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LASA (GALARINI et al., 2011).

To avoid deleterious effects on consumers, MRLs have been established for some quinolones in foodstuffs of animal origin in European Union (Commission Regulation 2010). According to Commission Regulation (EU) No. 37/2010, these antibiotics are not permitted in laying hens which eggs are produced for human consumption. Nevertheless, quinolones are still used in animal production systems, particularly in the poultry farming, for the prophylaxis of *Salmonella spp.* infections in laying hens but, at the same time, they are the antimicrobials of choice for treatment of severe or systemic human salmonellosis. Therefore, the use of antimicrobial agents in animals intended to human consumption is probably the main cause for the occurrence and spread of resistant *Salmonella* strains (ANNUNZIATA et al., 2016).

For sulfonamides, the European Commission established the maximum residue limits (MRL) of $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in muscle, fat, liver, kidney and milk (EUROPEAN COMMISSION, 2010), while no MRLs have been set in eggs and therefore in these matrices the control levels should be As Low As Reasonably Achievable (ALARA) (SANCO, 2008). The Italian authorities have included in the National Regulatory Monitoring Plan of drug residues and contaminants in products of animal origin (Piano Nazionale Residui 2015 – P.N.R. 2015) the control of sulfonamides in eggs, suggesting as “limit of action” for screening methods detection capability ($\text{CC}\beta$), a level between 10 and $50\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (SUMMA et al., 2015). Although the administration of sulfonamides is not authorized for laying hens, extra-label use of these compounds can be a possible way for sulfonamide residues to occur in eggs for human consumption. Thus, it is strongly recommended that sulfonamides residues monitoring in eggs must be included in the scope of the National Residues Control Plan. Currently, no MRL has been adopted for sulfonamide residues in eggs in Brazil. In this case, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) adopts a value of $10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (as action level (AL)) (IN 11 MAPA, 2014) for substances whose MRLs have not yet been established (MAURICIO; LINS; ALVARENGA, 2009).

Despite the fact that are multiclass, multiresidue screening methods available for even over hundreds of analytes in a variety of matrices (KAUFMANN et al., 2008; PETERS et al., 2009; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015; PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016), there are still not many methods suitable for analysis of egg samples. Quantitative multi-multi methods which fulfil the criteria of the European Commission Decision 2002/657/EC for eggs were already reported (GARRIDO FRENICH et al., 2010; GAJDA et al., 2012; PIATKOWSKA; JEDZINIAK; ZMUDZKI, 2016) and they cover several dozen of analytes.

The aim of this work was the development and validation of a multiclass, multiresidue method based on LC-MS/MS to monitoring residues of veterinary drugs belonging to coccidiostats, quinolones and sulfonamides classes (in a total of 35 compounds) in whole eggs to further inclusion on the NRCP.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Acetonitrile (ACN) was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid 88% and ammonium formate 99% were purchased from J.T.Baker (Phillipsburg, USA). Ultrapure water was supplied by a Milli-Q purification system (Darmstadt, Germany). Analytical standards of dichloroisovernic acid, nalidixic acid, oxolinic acid, amprolium hydrochloride, ciprofloxacin, monensin sodium salt hydrate, salinomycin monosodium salt hydrate, sulfachlorpyridazine, sulfadimethoxin and sulfadoxin were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Clopidol, danofloxacin mesylate, decoquinate, diaveridine, diclazuril, difloxacin hydrochloride, enrofloxacin, ethopabate, flumequine, lasalocid A sodium salt, maduramicin ammonium salt, dinitrocarbanilide, norfloxacin, robenidine, robenidine-d8 hydrochloride, sarafloxacin hydrochloride, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, sulfathiazole, toltrazuril, trimethoprim, enrofloxacin-d5 HCl, sulfapyridine and decoquinate-d5 were obtained from Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Dinitrocarbazine-d8 was purchased from Witega Laboratorien (Berlin, Germany). Narasin was obtained from USP (U.S. Pharmacopeia) and semduramicin sodium was from Phibro Animal Health Brazil (Sao Paulo, Brazil).

2.2. Standard solutions

Individual stock standard solutions ($1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were prepared in methanol (for amprolium, ethopabate, narasin, monensin, robenidine, robenidine-d8, sulfonamides and fluoroquinolones) and in chloroform/ACN 50/50 (v/v) for decoquinate and decoquinate-d5. Dichloroisovernic acid, diaveridine, lasalocid A, maduramicin, salinomycin, semduramicin and trimethoprim were dissolved in acetonitrile. Dinitrocarbanilide was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The stock solutions were prepared individually for each analyte, stored in a freezer (-30°C to -10°C) and were valid for 6 months. Due to the properties of the compounds present in this method, different solvents were used. Three intermediate solutions ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were prepared using ACN to dilute coccidiostats and methanol to sulfonamides and

quinolones. Intermediate solutions were valid for 3 months and stored in a freezer (-30°C to -10°C). The working solution was prepared by the dilution of 1 mL of each intermediate solution to obtain a final concentration of $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in ACN. Working solution has a validity of one month stored in a freezer (-30°C to -10°C). A mixed solution of internal standards (IS) was prepared separately for each class.

2.3. LC-MS/MS

The LC-MS/MS system consisted of an Agilent 1260 series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, a degasser, an auto sampler, a column heater, a diverter valve (Valco Instruments Co., Inc., USA) and a triple quadrupole mass analyzer QTRAP 5500 (AB Sciex, Canada). The experiments were carried out in the positive and negative ionization electrospray mode, simultaneously. The LC-MS/MS data acquisition and processing was performed by Analyst 1.5.2.

Turbo Ion Spray source was operated at 400°C with the capillary voltage set at 4500V and -45000V. Nitrogen was used as a nebulizer gas, curtain gas and collision gas. The ions were monitored using the multiple reaction monitoring mode (MRM) for two transitions with a dwell time of 100msec. The compound-dependent parameters are reported in the Table 1.

The chromatographic separation was carried out using a Kinetex C18 column (2.6 μm , 50mm \times 2.1 mm; Phenomenex, USA) with guard column (Phenomenex, USA). The mobile phase was composed by 0.1% formic acid in 1mmol/L ammonium formate aqueous (A) and 0.1% formic acid in 1mmol/L ammonium formate acetonitrile (B). The flow rate was 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and a 2 min equilibration time was applied. The gradient started with 2% of B increasing to 95% in 6 min kept for 4 min and decreasing to 2% in 11 min and kept for 1 min. The column temperature was maintained at 40°C and injection volume was 10 μL .

2.4. Sample preparation

Blank samples were used for calibration, quality control (QC), and validation purposes. Matrix-matched calibration curves were prepared adding 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 and 40.0 μ L of mixed working standard solution containing all analytes and 20 μ L of IS mixture to 2g of blank sample. QC samples were prepared at one level, at MRL or validation level adopted (VLA). This concentration was the central point of the linear range of the calibration curve.

An aliquot of 2g of homogenized sample was weighed into a 50mL polypropylene tube. Samples were fortified with mixed working standard solution and 20 μ L of IS mixture. An amount of 10mL of 0.1% formic acid in ACN solution was added to the samples. These mixtures were extracted using a tissue disruptor (Ultra Turrax $\text{\textcircled{C}}$) and kept under agitation, at 180rpm, for 20min. After that, samples were centrifuged for 10min at 3,500g at -5 $^{\circ}$ C. The top layer was transferred to a 15ml polypropylene centrifuge tube and stored in the freezer at -20 $^{\circ}$ C for about 45minutes. Following, samples were submitted to another centrifugation for 10min at 3,500g at -5 $^{\circ}$ C. Supernatant was transferred to a 50mL centrifuge tube, evaporated to dryness at 45 $^{\circ}$ C under a gently nitrogen flow, then reconstituted with 2mL of hexane and 2mL 0.1% formic acid in ACN/water (20:80). Following, 1mL of the extract was transferred to a vial to be analyzed by LC-MS/MS.

2.5. Method validation

Method validation was carried out as described elsewhere (HOFF et al., 2014) and validated according to the European Decision 2002/657/EC (EUROPEAN COMMISSION, 2002) for quantitative and confirmatory purposes. Validation parameters such as linearity, limit of quantification (LOQ), recovery, veracity, reproducibility, decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) were determined. Six-point matrix-matched calibration curves spiked at the levels of 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 and 3.0 times the validation level adopted (VLA) were obtained by plotting the response of the respective analyte/internal standard peak area ratio versus the analyte/internal standard concentration.

3. Results and discussion

3.1. LC-MS/MS

Considering the wide range of compounds, optimization of ions and MS/MS parameters were conducted using both positive (ESI+) and negative (ESI-) ionization. It means, the experiments were carried out in the positive and negative ion electrospray mode simultaneously, using the polarity switching mode. Sulfonamides, fluoroquinolones and trimetoprim were detected in positive ionization mode. Coccidiostats were detected in both ESI+ and ESI-. Compound-dependent parameters and source-dependent parameters were optimized for each class. The parameters: parent ion (Q1), daughter ions (Q3), dwell time, declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), cell exit potential (CXP) and retention times (RT) were optimized and the results obtained are presented in Table 2. The MRM transitions were also showed in Table 2. At least two transitions were selected for identification, being the most intense used for quantification.

As the first step on method development, the selection and tuning of the precursor and product ions were carried out. Direct infusion of individual veterinary drugs standards was performed, in positive or negative ionization mode, depending on analyte. The mass spectra for all analytes were obtained along with analyte-dependent parameters, such as collision energy and tube lens, which were optimized and calculated automatically. For each compound, the MRM transition with the highest intensity was used for quantification (quantifier ion), while the other transition was used for confirmation (qualifier ion).

The protonated ($[M+H]^+$, positive mode) and deprotonated ($[M-H]^-$, negative mode) molecular ions were selected as the precursor ions for the majority of the compounds. Electrospray parameters, such as sheath gas, auxiliary gas, spray voltage and capillary temperature, were also optimized. The optimization was performed using flow injection analysis (FIA) where the flow solution was the mobile phase in different proportions of aqueous/organic solvent. MS parameters were optimized in both positive and negative ionization modes varying one parameter each time. The spray voltage was set in the maximum optimum value obtained in positive ionization mode

(4500V), while in negative ionization mode was set in lower value (-4500V) due to electric discharges observed in the ion source at highest negative voltages. The capillary temperature was set at high temperature in positive ionization mode (400°C) because was observed a slightly enhance of the peak area of some analytes (those who eluted in the final minutes of chromatographic run) under this condition. (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015). Finally, the optimization of sheath and auxiliary gases revealed rather insignificant differences between the values tested.

3.2. Sample preparation

Sample preparation protocols were developed aiming simplicity and satisfactory recovery rates. Considering that, the best compromise between analyte recovery and wide scope of substances was chosen.

Because target analytes have different polarities, and consequently a different distribution between yolk and albumen, the method was carried out on the whole egg, after a carefull homogenization. The extraction solvent must be able to extract the analytes of interest, minimizing the co-extraction of other matrix components. Moreover, it is also important to take into account the compatibility of the solvent with the following analytical steps (e.g. extract clean-up, pre-concentration, or the analytical technique itself). Taken this in account, ACN with 0.1% formic acid was used as extraction solvent. ACN was the solvent of choice for the extraction method due to its high efficiency for extracting many compounds residues from different matrices, even in samples with high fat content (DANAHER et al., 2007). Moreover, ACN has a high capacity to promote protein precipitation. The use of methanol as organic extraction solvent was not considered after initial tests since ACN showed better recoveries rates and reduced the co-extraction of matrix interferences. The addition of 0.1% formic acid to the reconstitution solution increased the peak areas of many analytes in the ESI+ but showed a decrease in the extraction efficiency for FQs. For FQs, aqueous formic acid/ACN was shown to be the most effective solvent mixture for extraction, as also reported by other authors (PECORELLI et al., 2003; HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007). Since FQs have in their

structure a piperazinyl moiety with two pKa values ($pK_{a1} = 5.5-6.0$, $pK_{a2} = 7.5-8.5$), they behave as zwitterions at neutral pH and consequently, they are difficult to extract in a polar solvent (such as ACN). However, when acidic conditions are used (ACN and formic acid $pH < 7$), the aqueous solubility of FQs increases if they are in cationic form (HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007). Better and more reproducible extraction yields were observed by acidifying water with formic acid, especially for those quinolones with an amino group. Maybe, protonation of these molecules had the double effect of liberating that fraction of quinolones bound to lipoproteins, which are abundantly present in the egg, and making them more water soluble.

The clean-up efficiency of LTP procedure was observed with a freezing time of about 45min, at -20°C , which gives removal of co-extractives from matrix. Methods based on this clean-up technique have been used predominantly for pesticides residues analysis in different matrices (GOULART et al., 2008; PINHO et al., 2010). In these procedures, generally the extract is obtained adding organic solvent to the sample, and the clean-up is performed by freezing this extract at -20°C . Under this condition, the interfering compounds precipitate, whereas analytes remain in the liquid phase and are subsequently separated.

An additional step applying hexane to fat removal was applied. After the concentration step, the dry extract is reconstituted with hexane. Following, the mobile phase mixture is added and a liquid-liquid extraction is performed. The addition order of the solvents is a critical point: if aqueous solution is added before hexane, high levels of emulsification were observed.

3.3. Method validation

Validation is a required process for analytical methods. However, scope extension, i.e. inclusion of more analytes, other matrices and/or minor changes in extraction procedures, can be achieved without a full validation protocol, which requires time and is laborious to the laboratory. Scope extension usually is performed through the execution of a new full validation process, in order to demonstrate the

fitness of the method for the proposed inclusions. However, in some cases where the scope extension consists in the addition of a very similar matrix and/or a closely related analyte, shot validation protocols has been applied with similar results. Herein, we use simpler and faster validation protocols specifically designed for validation of the scope extension, combining the Decision 2002/657/EC approach with the use of quality control data obtained in routine analysis. In our laboratory protocol, the validation process starts with the linearity evaluation and the determination of the working range, followed by LOQ, recovery, veracity, reproducibility, decision limit ($CC\alpha$), detection capability ($CC\beta$), and matrix effect determination. By using calibration curves prepared in the matrix, several of these parameters can be determined in a single experiment. Generally, a calibration curve with six points (0 + 5) is used, having at its center at the MRL or another adopted target concentration level. For the present study, validation level adopted (VLA) for all compounds is $10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and a experimental LOQ of $2.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.3.1. Selectivity

Although method selectivity is not a property of an instrumental technique, but of an analytical procedure, undoubtedly mass spectrometry assures high selectivity standards when MS/MS in tandem experiments are carried out. Selectivity requirements were observed evaluating the ion ratio of two selected fragments (Table 1) in both unknown sample and the matrix-matched standard. These criteria fully agree with those proposed by Nielen et al. updating Commission Decision 2002/657/EC (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Method selectivity can be confirmed by the analysis of extracted ion chromatograms of all analytes and internal standards at validation level (**Figure 2. Appendix A. Supplementary material**).

3.3.2. Linearity

The linearity of calibration curves was assessed using a six-point calibration curve of standards in blank egg fortified at different concentrations ($2.5\text{--}20\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). This number of levels was chosen in order to achieve the optimal concentration range

for each target analyte, considering the large differences in sensitivity between the analytes. Each calibration standard was injected in triplicate. Peak area ratio of analyte/IS was used as the analytical response versus concentration. Calibration curves were obtained by least-squares linear regression analysis and acceptable linear regression r^2 values were obtained for all compounds. Determination coefficient values for standard solution curves were >0.99 and to egg matrix-matched calibration curves, except for amprolium and decoquinate, which presented r^2 equal to 0.95 and 0.96, respectively. Notwithstanding, all results are within the criterion of acceptability presented in the Manual of Quality Assurance of MAPA (MAPA, 2015). Based on these results, an adequate linearity was achieved for all analytes.

3.3.3. Recovery and Veracity

The method veracity was estimated throughout recovery experiments. Average recoveries for each analyte at the validation level adopted ($10\mu\text{g.kg}^{-1}$) were calculated through the analysis of 21 replicates. Veracity was determined by the comparison between the calculated concentration of each analyte in standard addition samples (R, from “recovery samples”) and theoretical concentration. Veracity results are given in Table 2. Calculations were performed according to the following equation:

$$\text{Veracity} = \text{Concentration R/Theoretical concentration} \times 100$$

Relative recoveries (RE_R) were determined using the approach proposed by Matuszewski to quantitative estimation of matrix effects, as described elsewhere (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003). In this method, losses caused by matrix effects are not taken into account to calculate recovery: just the losses caused by the sample preparation method are considered. RE_R is calculated using the raw signal of each analyte peak, by the comparison between matrix-matched samples (TS from “tissue standard”), considered as 100% and standard addition samples (R from “recovery samples”) (HOFF et al., 2015a). Calculations were performed according to the following equation:

$$RE_R(\%) = \text{Peak area R/Peak area TS} \times 100$$

This parameter is of great value since it indicates the recovery of each analyte within the whole working range of concentrations in egg. For the majority of the analytes, recoveries values were in the range 30.6- 63.4%. Egg is a complex matrix, with a high content of protein and lipid. The analytes may bind to the lipoproteins and not be sufficiently extracted from the matrix. The presence of phospholipids in egg add an extra element of complexity, due to the emulsification properties of these compounds. In conclusion, although for several compounds the recovery values are far from 100%, they are considered acceptable based on three evidences: i) recovery values were reproducible; ii) calibration curves were prepared in matrix, with the same losses caused by the sample preparation process, and iii) the use of internal standards promote a compensation for additional extraction differences from sample to sample. Moreover, the veracity for the concentration used to determine recovery ($10\mu\text{g.kg}^{-1}$) are within the range of acceptance (70 to 100%) (MAPA, 2011), with the exception of monensin (112.8%, Table 2).

3.3.4. Precision

The precision was demonstrated in terms of repeatability (intra-day precision), which was expressed as the CV% coefficient of variation values from a set of 21 replicates at the VLA in egg samples. Repeatability results in egg spiked samples ($n = 21$) are presented in Table 2. Only four veterinary drugs (sulfachlorpyridazine, ciprofloxacin, difloxacin and flumequine) showed CV% values around 18% (Table 2) but also under the highest acceptable value (20%) (MAPA, 2011). These results indicate satisfactory precision and an adequate reliability of the developed method.

3.3.5. $CC\alpha$ and $CC\beta$

The decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$) were calculated plotting all data obtained from the precision experiments and applying the calibration

curves approach as described in Commission Directive 2002/657/EC and also in conformity with the ISO11843. Briefly, the signal was plotted against the added concentration and the corresponding concentration at the y-intercept plus 1.64 times the standard deviation of the within-laboratory reproducibility gives the $CC\alpha$ values. $CC\beta$ was calculated by summing of the concentration at the $CC\alpha$ and 1.64 times the standard deviation of the within-reproducibility of the mean measured content at the VLA. Table 2 show the $CC\alpha$ and $CC\beta$ values obtained in this study. The analytical parameters $CC\alpha$ and $CC\beta$ are important to estimate the level of confidence in the routine analytical results and are normally used to prevent the reporting of false positive and false negative findings, respectively. Although these parameters do not present criteria for upper limits, all compounds presented coherent values and were considered as acceptable.

3.3.6. Matrix effects (ME)

When complex samples, such as milk, muscle or egg (products of animal origin) are analyzed, LC-MS/MS measurements, especially in the ESI mode, might significantly be influenced by matrix effects. Matrix effects derive from various physical and chemical processes and may be difficult or impossible to eliminate completely. ME are related to the concentrations and protonation levels of co-extracted components and can be variable and unpredictable. ME affect the ionization efficiency of the analytes, leading to suppression or enhancement of the signal depending on the analyte/matrix combination. Obviously, this affects the quantification, thus actions for minimize or compensate ME are necessary (HOFF et al., 2015b; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015). There is no consensus on how this phenomenon should be assessed during method validation. Several approaches for ME evaluation, based on procedures published in the scientific literature such as post-column infusion, calibration curves comparison, quantitative estimation based in standards, spiked samples and matrix-matched control comparison and control charts evaluation has been described (HOFF et al., 2015b). To assess the impact of the ME in the present method, the following actions were taken: i) use of isotope labeled internal standards

to compensate ME, ii) the use of solvent mixture 0.1% formic acid in ACN/water (20:80) is showed as to be critical to minimize ME, iii) the injection volume was optimized to 10 μ L in order to decrease ME, and iv) evaluation of the effect of surrogate/internal standards in the correction of ME.

4. Application to real samples

The method was applied to the analysis of 391 samples from July/2015 to December/2016. A total of 103 samples showed quantifiable results for at least one of the analytes. Figure 1 shows the occurrence of veterinary drugs residues presence in eggs. The antimicrobials that presented the highest incidence were enrofloxacin (41%), 4,4'-dinitrocarbanilide (22%), ciprofloxacin (6%), trimethoprim and sulfamethazine (6%).

A total of 13 samples were quantified with values above 20 μ gkg⁻¹. ENRO was present in 5 of these 13 samples (721.33, 115.2, 100.5, 136.0 and 144.33 μ gkg⁻¹). DNC was present in 3 samples (73.33, 53.7 and 52.27 μ gkg⁻¹), TMP was also present in 3 samples (137.33, 127.07 and 151.33 μ gkg⁻¹). CIPRO and SMZ were present in one sample each: 268.5 and SMZ, respectively.

For fifteen samples, contaminations with more than one antimicrobial were found (Table 3). Four of these samples (A10, A11, A12 and A13) have been contaminated with sulfamethazine and trimethoprim. Quantifiable simultaneous occurrence of enrofloxacin and ciprofloxacin was found in four samples (A1, A2, A3 and A15). In seven samples (A4, A5, A6, A7, A8, A9 and A13) were found nicarbazin and enrofloxacin. Three antimicrobials were quantified in samples A13 (enrofloxacin, semduramicin and nicarbazin) and A14 (nicarbazin, sulfamethazine and trimethoprim). Figure 3 (**Appendix A. Supplementary material**) presents the extracted ion chromatograms of samples A5 and A10.

These data show an overview of the use of antimicrobials in the laying hens production, including systemic antibiotics which use is forbidden in eggs production in Brazil. This scenario shows the urgent need to develop multistep methodologies for the monitoring of contaminant residues in eggs.

These data are in agreement with a survey performed in the Paraná state (State Program for the Control of Residues of Veterinary Medicines in Foods of Animal Origin - PAMvet-PR) (MACHINSKI JUNIOR et al., 2005), in which the use of veterinary drugs not permitted for laying hens were reported by several producers.

A comparison between the veterinary drugs with the highest occurrence in the period July/2015 to December/2016 with commercial formulations available in Brazil (available on the electronic site of Compendium of Veterinary Products, <http://www.cpv.com.br>) is presented in Table 4. Enrofloxacin, the most prevalent antimicrobial in eggs samples (41%), had a greater quantity of commercial products available for use (14). Sulfamethazine and trimethoprim, presented the same percentage of occurrence in eggs (6%, Fig. 1) and are generally associated in veterinary formulations (Table 4). The presence of ciprofloxacin is probably due to the metabolism of enrofloxacin, which produces ciprofloxacin *in vivo*. However, the absence of ciprofloxacin in some incurred samples with enrofloxacin (A4 to A9 and A13, Table 3) may be related to the withdrawal period. The products listed in Table 4 are administered orally in drinking water or mixed in poultry feed.

5. Conclusions

The presented method was found to be suitable for the analysis of residues of veterinary drugs in eggs. Validation results were satisfactory and the method could be successfully applied for both quantitative and confirmatory purposes. The method was applied for hundreds of real samples and the data resulting showed that the co-occurrence of multiclass residues in eggs is a fact. Thus, the development and validation of multiclass multiresidue methods able to analyze is an urgent need for the official monitoring programs. Multiresidue multi-class methods are also much more rational than single residues methods for application in official monitoring programs, because they reduce the needs for sampling and transport. The present method permits a cost reduction of at least three times, considering that before the development of this method, three analyses were necessary to provide the same data (one for each class: quinolones, sulfonamides and coccidiostats). As a consequence, a increase in the

number of samples can be achieved, contributing to the Federal Inspection System and, consequently, to the public health.

The method is currently included in the NRCP scope, providing a fast and simple protocol for sample preparation associated with a high specific and sensible analytical method.

Acknowledgements

This research was funded by the Brazilian Ministry of Agriculture (MAPA), and was developed at the Laboratory of Pesticides and Veterinary Drugs Residues Analysis (RPM-LANAGRO/RS).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in attachment with extracted ion chromatograms for all analytes plus internal standards and also for extracted ion chromatograms of real incurred samples A5 and A10.

References

ANNUNZIATA, L.; VISCIANO, P.; STRAMENGA, A.; COLAGRANDE, M. N.; CAMPANA, G.; SCORTICHINI, G.; MIGLIORATI, G.; COMPAGNONE, D. Development and Validation of a Method for the Determination of Quinolones in Muscle and Eggs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 8, p. 2308–2320, 2016.

BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIANSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 1–15, 30 nov. 2011.

DANAHER, M.; DE RUYCK, H.; CROOKS, S. R. H.; DOWLING, G.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 845, n. 1, p. 1–37, 1 jan. 2007.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103–121, 23 jun. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Directive 96/23/EC. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. . 2002, p. 8–36.

EUROPEAN COMMISSION. n°610/2012. Commission Regulation (EU) No 610/2012 of 9 July 2012 amending Regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union. . 2009.

EUROPEAN COMMISSION. 37/2010. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. . 2010, p. p.1-72.

FRY, M.; WILLIAMS, R. B. Effects of decoquinat and clopidol on electron transport in mitochondria of *Eimeria tenella* (Apicomplexa: coccidia). **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 2, p. 229–240, 15 jan. 1984.

FURUSAWA, N. Transference of Dietary Veterinary Drugs into Eggs. **Veterinary Research Communications**, v. 25, n. 8, p. 651–662, 2001.

GAJDA, A.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; GBYLIK, M.; BLADE, T. Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 430–439, 2012.

GALARINI, R.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; PETTINACCI, L.; DUSI, G. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. **Selected papers presented at the 6th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug**

Residue Analysis Gent, Belgium, 1-4 June 2010HVDA-2010, v. 700, p. 167–176, 26 ago. 2011.

GARRIDO FRENICH, A.; AGUILERA-LUIZ, M. DEL M.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 150–160, 28 fev. 2010.

GOULART, S. M.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 15 jun. 2008.

HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, n. 1–2, p. 63–70, 26 jan. 2007.

HOFF, R. B.; BARRETO, F.; MELO, J.; MARTINS, M. T.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M. DO C. R. Scope extension validation protocol: inclusion of analytes and matrices in an LC-MS/MS sulfonamide residues method. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 1, p. 39–47, 2 jan. 2014.

HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M. DO C. R.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC–QqLIT-MS/MS). **Talanta**, v. 134, p. 768–778, 1 mar. 2015a.

HOFF, R. B.; RÜBENSAM, G.; JANK, L.; BARRETO, F.; RUARO PERALBA, M. DO C.; PIZZOLATO, T. M.; SILVIA DÍAZ-CRUZ, M.; BARCELÓ, D. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443–450, 15 jan. 2015b.

IN 11 MAPA. IN11. Instrução Normativa N°11, de 5 de Maio de 2014. . 2014.

JACOBS-REITSMA, W. F.; KAN, C. A.; BOLDER, N. M. The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 228–231, 1 out. 1994.

KAN, C. A.; PETZ, M. Residues of Veterinary Drugs in Eggs and Their Distribution between Yolk and White. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6397–6403, 1 dez. 2000.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WIDMER, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **27th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides & Polynucleotides**, v. 1194, n. 1, p. 66–79, 13 jun. 2008.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8421–8431, 1 nov. 2005.

LIU, R.; HEI, W.; HE, P.; LI, Z. Simultaneous determination of fifteen illegal dyes in animal feeds and poultry products by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 24, p. 2416–2422, 15 ago. 2011.

MACHINSKI JUNIOR, M.; BENINI, A.; NETTO, D. P.; NUNES, M. P.; VEDOVELLO FILHO, D.; BENATTO, A.; SCUCATO, E. S.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; LOPES, M. O.; BOSQUIROLI, S. L. **Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná**PAMvet/PR, , 2005.

MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Secretaria de Defesa Agropecuária. 1ª ed. Brasília: [s.n.].

MAPA. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, , 2015.

MARK WEBBER; LAURA J.V. PIDDOCK. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. **Vet. Res.**, v. 32, n. 3–4, p. 275–284, maio 2001.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 1 jul. 2003.

MAURICIO, A. DE Q.; LINS, E. S.; ALVARENGA, M. B. A National Residue Control Plan from the analytical perspective—The Brazilian case. **Papers presented at EuroResidue VI**, v. 637, n. 1–2, p. 333–336, 1 abr. 2009.

PECORELLI, I.; GALARINI, R.; BIBI, R.; FLORIDI, A.; CASCIARRI, E.; FLORIDI, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. **4th International Symposium on Hormone and Veterinary Residue Analysis.**, v. 483, n. 1–2, p. 81–89, 25 abr. 2003.

PETERS, R. J. B.; BOLCK, Y. J. C.; RUTGERS, P.; STOLKER, A. A. M.; NIELEN, M. W. F. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. **Hormones and Veterinary Drugs State-of-the-art and emerging technologies**, v. 1216, n. 46, p. 8206–8216, 13 nov. 2009.

PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, Part A, p. 571–580, 15 abr. 2016.

PINHO, G. P. DE; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. DE; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, 2010.

RIBEIRO, C. C.; ORLANDO, R. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Electric field-assisted solid phase extraction and cleanup of ionic compounds in complex food matrices: Fluoroquinolones in eggs. **Talanta**, v. 152, p. 498–503, 15 maio 2016.

ROBERT, C.; GILLARD, N.; BRASSEUR, P.-Y.; PIERRET, G.; RALET, N.; DUBOIS, M.; DELAHAUT, P. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 3, p. 443–457, 1 mar. 2013.

SANCO. Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC². . 2008.

SØRUM, H.; L'ABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria—a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **18th International Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene, August 18-23, 2002, Lillehammer Norway. Necessary and Unwanted Bacteria in Food - Microbial Adaption to changing Environments**, v. 78, n. 1–2, p. 43–56, 15 set. 2002.

SUMMA, S.; LO MAGRO, S.; ARMENTANO, A.; MUSCARELLA, M. Development and validation of an HPLC/DAD method for the determination of 13 sulphonamides in eggs. **Food Chemistry**, v. 187, p. 477–484, 15 nov. 2015.

TEWARI, A. K.; MAHARANA, B. R. Control of poultry coccidiosis: changing trends. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, n. 1, p. 10–17, 2011.

Table 1

Mass spectrometry parameters used for the detection and confirmation of coccidiostats, quinolones and sulfonamides. IS – Internal standard and number 1 and 2 are first fragment (**bold**) and second fragment (normal).

Group	Analytes	RT(min)	Parent Ion (m/z)	Daughter Ions (m/z)	DP (V)	CE (V)
ESI+	Clopidol (CLOP)	2.87	191.9	87.0	51	39
				100.8	51	35
	Ethopabate (ETB)	4.53	238.07	206.0	111	13
				136.0	111	35
	Amprolium (AMPRO)	0.45	242.9	150.2	46	15
				122.3	36	31
	Diaveridine (DIAV)	3.39	261.3	245.0	161	35
				122.9	171	29
	Robenidine (ROBE)	5.41	333.9	154.9	146	35
				138.0	141	33
Decoquinatate (DECQ)	6.88	417.96	372.2	221	31	
			204.0	221	55	
Coccidiostats	Lasalocid A (LASA)	7.73	608.26	573.2	31	19
				555.2	31	23
	Monensin (MONE)	8.00	688.298	635.2	76	21
				461.2	76	33
	Salinomycin (SALI)	8.00	768.362	733.3	61	25
				715.2	61	33
	Narasin (NARA)	8.33	782.39	747.3	106	27
				729.3	106	31
	Semduramicin (SEMD)	7.54	890.355	629.3	41	35
				647.3	41	27
	Maduramicin (MADU)	8.38	934.372	629.3	36	35
				647.3	36	25
	Ciprofloxacin (CIPRO)	3.74	332.1	314.2	51	25
				288.2	51	23
	Enrofloxacin (ENRO)	3.85	360.2	316.3	51	27
				245.2	51	37
Norfloxacin (NOR)	3.68	320.2	276.3	51	25	
			233.2	51	33	
Nalidixic acid (NALID)	4.84	233.2	215.2	100	21	
			187.0	100	35	
Quinolones	Difloxacin (DIFLO)	4.03	400.1	356.0	21	31
				299.3	21	39
	Sarafloxacin (SARA)	4.00	386.2	342.1	41	29
				299.0	36	37
	Flumequine (FLU)	4.94	262.3	244.2	126	21
				202.3	126	43
Oxolinic Acid (OXO)	4.45	262.1	244.2	66	23	
			216.0	66	39	
Danofloxacin (DANO)	3.81	358.4	96.2	100	30	
			340.3	100	30	

Table 1 (Continue)

Mass spectrometry parameters used for the detection and confirmation of coccidiostats, quinolones and sulfonamides. IS – Internal standard and number 1 and 2 are first fragment (**bold**) and second fragment (normal).

Group	Analytes	RT(min)	Parent Ion (m/z)	Daughter Ions (m/z)	DP (V)	CE (V)
Sulfonamides	Sulfadiazine (SDZ)	2.55	251.2	156.1	16	23
				108.2	16	31
	Sulfamethoxazole (SMA)	4.16	254.2	156.1	41	21
				108.0	41	33
	Sulfathiazole (STZ)	3.16	256.1	156.1	1	21
				108.0	1	39
	Sulfamethazine (SMZ)	3.68	279.2	108.0	26	29
				156.2	26	13
	Sulfaquinoxaline (SQX)	4.60	301.2	156.2	11	21
				108.1	11	37
	Sulfadimethoxin (SDMX)	4.57	311.2	156.1	16	31
				108.1	16	39
	Sulfadoxin (SDX)	4.16	311.2	108.2	31	35
				245.1	31	27
Sulfachlorpyridazine (SCP)	4.01	285.0	108.0	31	35	
			156.0	31	35	
Sulfamerazine (SMR)	3.35	265.0	156.0	100	25	
			108.0	100	25	
Trimethoprim (TMP)	3.53	290.8	230.2	201	31	
			275.0	201	35	
Robenidine D8 (ROBE-D8)	5.39	342.1	182.0	176	29	
			184.0	176	27	
Decoquinatate D5 (DECQ-D5)	6.86	423.4	377.2	236	33	
			205.0	236	55	
IS	Enroloxacin D5 (ENRO-D5)	3.85	365.2	321.3	51	27
				245.0	51	37
ESI-	Sulfapyridine (SPY)	3.16	250.1	156.0	26	23
				108.0	26	33
Coccidiostats	Dichoroisoverninic Acid (DIA)	4.31	248.9	205.0	-5	-20
				190.0	-20	-26
Coccidiostats	Dinitrocarbazine (DNC)	5.81	301.0	137.0	-50	-18
				106.8	-55	-50
Coccidiostats	Diclazuril (DICLA)	6.03	404.9	333.8	-15	-28
				335.8	-60	-26
Coccidiostats	Toltrazuril (TOL)	6.20	424.1	424.1	-85	-8
IS	Dinitrocarbazine D8 (DNC-D8)	5.80	308.9	141.2	-30	-22
				111.0	-75	-50

Table 2

Summary of the calculated parameters from the validation study.

Group	Analytes	CC α ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Veracity (%)	CV (%)
ESI+	Amprolium (AMPRO)	13.5	16.9	100.8	8.2
	Clopidol (CLOP)	11.9	13.8	87.7	13.1
	Ethopabate (ETB)	11.7	13.4	96.9	10.5
	Diaveridine (DIAV)	12.1	14.1	91.0	13.8
	Trimetropim (TMP)	10.8	11.6	100.6	4.8
	Robenidine (ROBE)	10.5	11.0	91.0	3.2
Coccidiostats	Decoquinatate (DECQ)	10.6	11.2	98.8	3.7
	Lasalocid A (LASA)	10.6	11.2	104.9	6.9
	Monensin (MONE)	11.0	12.0	112.8	5.5
	Salinomycin (SALI)	11.2	12.5	108.7	7.0
	Narasin (NARA)	11.0	12.1	108.9	5.8
	Semduramicin (SEMD)	10.6	11.3	99.2	4.0
	Maduramicin (MADU)	12.0	14.1	96.5	13.1
	Ciprofloxacin (CIPRO)	13.9	17.7	82.2	18.7
	Enrofloxacin (ENRO)	13.7	17.4	97.2	13.3
	Norfloxacin (NOR)	13.3	16.5	85.5	13.2
Quinolones	Nalidixic acid (NALID)	12.7	15.4	98.3	16.8
	Difloxacin (DIFLO)	13.0	16.1	98.2	18.8
	Sarafloxacin (SARA)	12.5	15.0	87.5	17.5
	Flumequine (FLU)	12.9	15.8	98.3	18.1
	Oxolinic Acid (OXO)	12.9	15.8	99.2	17.9
	Danofloxacin (DANO)	13.7	17.5	108.6	13.7
	Sulfadiazine (SDZ)	11.4	12.8	88.8	10.9
	Sulfamethoxazole (SMA)	12.2	14.3	88.2	14.9
	Sulfathiazole (STZ)	11.8	13.6	90.1	12.2
	Sulfamethazine (SMZ)	12.3	14.6	92.4	15.2
Sulfonamides	Sulfaquinoxaline (SQX)	11.8	13.5	92.4	11.6
	Sulfadimetoxin (SDMX)	11.4	12.9	88.3	10.0
	Sulfadoxin (SDX)	11.5	13.0	85.5	10.7
	Sulfachlorpyridazine (SCP)	13.0	16.0	98.6	18.6
	Sulfamerazine (SMR)	12.0	13.9	87.7	13.7
ESI-	Dicloroisoverninic Acid (DIA)	12.90	15.8	109.9	16.1
	Dinitrocarbazine (DNC)	10.80	11.6	93.8	5.2
Coccidiostats	Diclazuril (DICLA)	10.8	11.5	97.2	4.7
	Decoquinatate (DECQ)	10.6	11.2	98.8	3.7
	Toltrazuril (TOL)	11.0	12.0	94.8	6.5

Table 3

Occurrence of more than one antimicrobial quantified in eggs with their respective concentration values ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) in the period July/2015 to December/2016. CIPRO: ciprofloxacin, DECQ: decoquinatate, DNC: dinitrocarbazine, ENRO: enrofloxacin, SEMD: semduramicin, SMZ: sulfamethazine and TMP: trimethoprim.

Antimicrobials	Real Sample														
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
CIPRO	2.7	5.2	19.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.1
DECQ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	0.0
DNC	0.0	0.0	0.0	9.5	11.0	9.3	6.6	2.1	13.7	0.0	0.0	0.0	73.3	0.0	0.0
ENRO	11.2	144.3	115.2	5.9	10.3	10.0	8.2	7.5	4.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	721.3
SEMD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.8	0.0	0.0
SMZ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	84.0	29.7	17.4	0.00	3.2	0.0
TMP	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	151.3	127.0	137.3	0.00	7.3	0.0

Table 4

List of commercial products available in SIDAN for use in poultry.

Active Principles	Associated(A) ou Not Associated (NA)	Quantity of comercial products
Enrofloxacin	NA	14
Sulfamethazin	Chlortetracycline and Trimethoprim*; Sulfaquinoxal; Trimethoprim and Dye (Methylene blue)*; Doxiciclina and Trimethoprim*; Trimethoprim*; Sulfaquinoxal and Bacitracin.	6
Trimethoprim	Chlortetracyclina and Sulfamethazine*; Sulfamethazine and Dye (Methylene blue)*; Doxycycline and Sulfamethazine*; Sulfamethazine*.	4
Nicarbazine	Narasin	1 (A) e 3 (NA)
Salinomycin	NA	2
Ciprofloxacin	NA	2

*They are the same commercial products.

**Occurrence of Contamination in Eggs with Antimicrobials
July/2015 to December/2016**

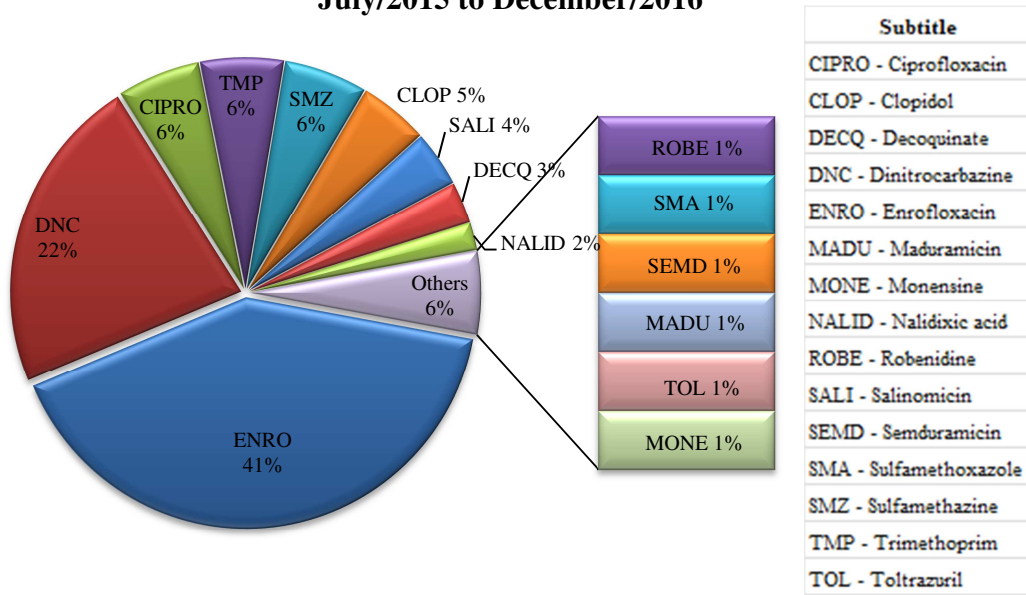


Figure 1. Occurrence of contamination in eggs with antimicrobials in the period July/2015 to December/2016.

Appendix A. Supplementary material

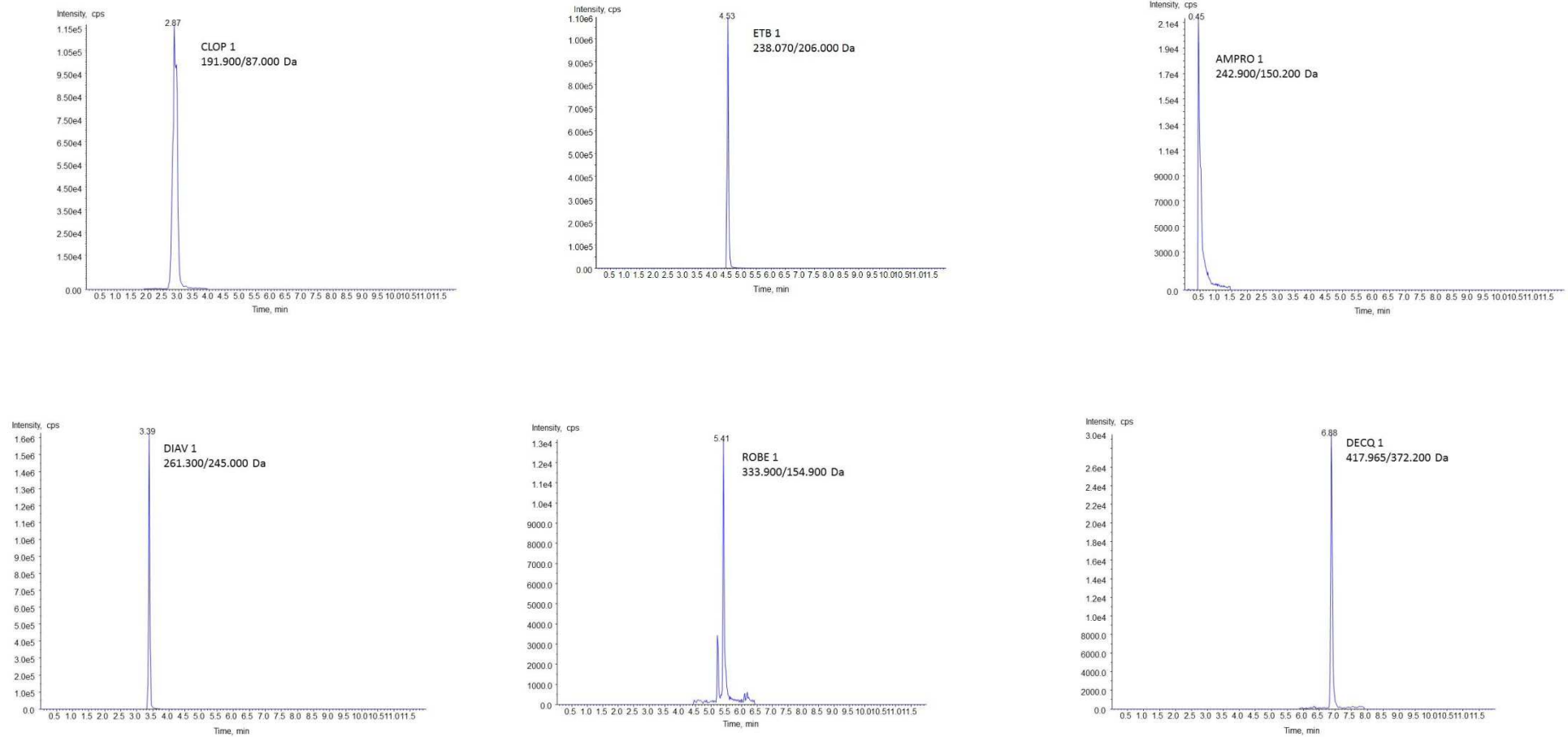


Figure 2.A. Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with coccidiostatics mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

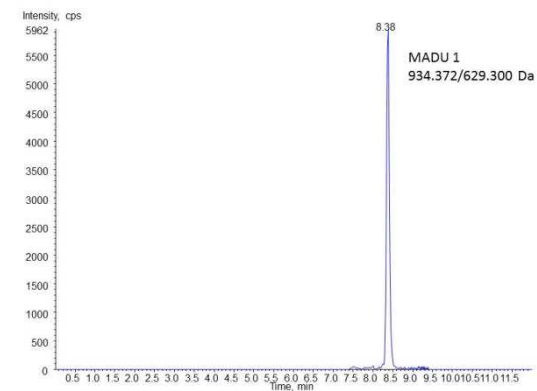
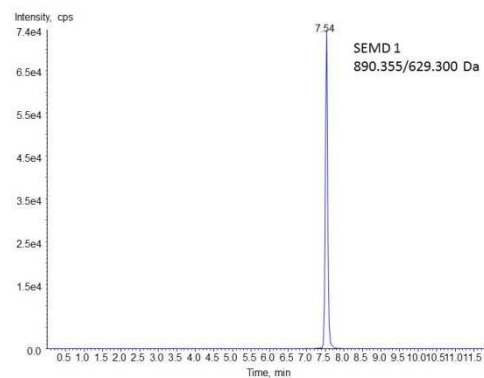
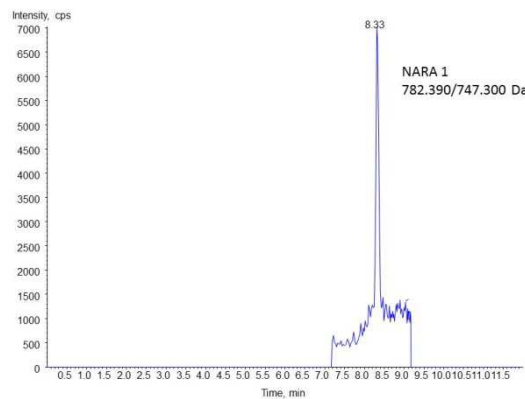
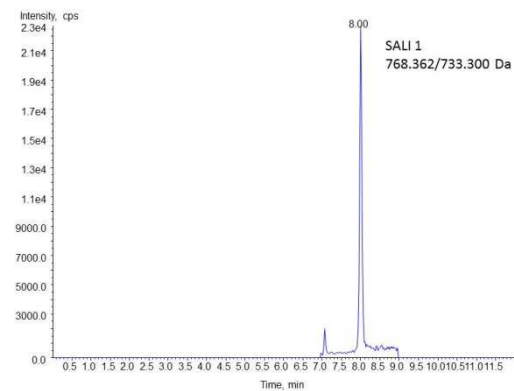
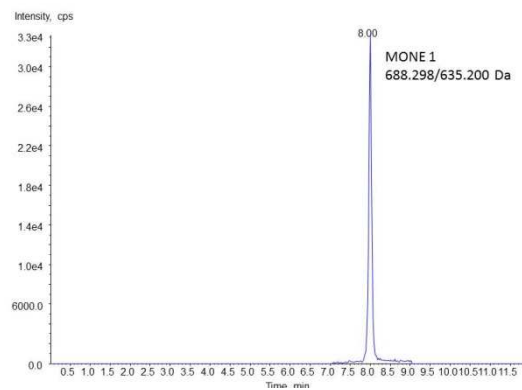
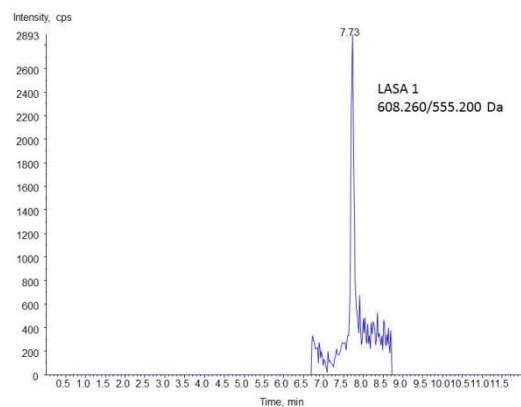


Figure 2.A. (Continue) Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with coccidiostatics mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

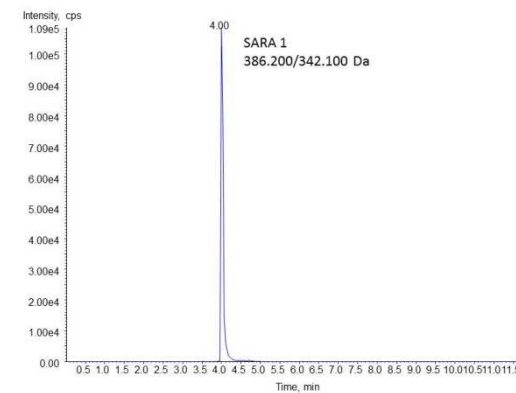
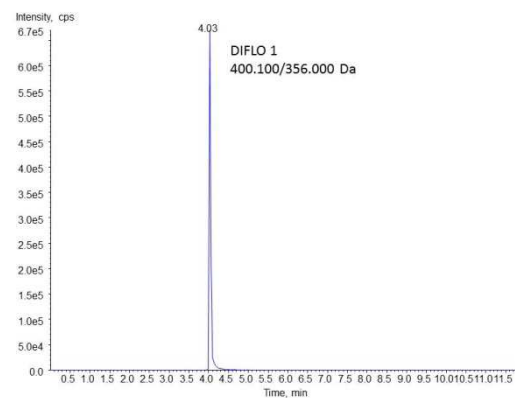
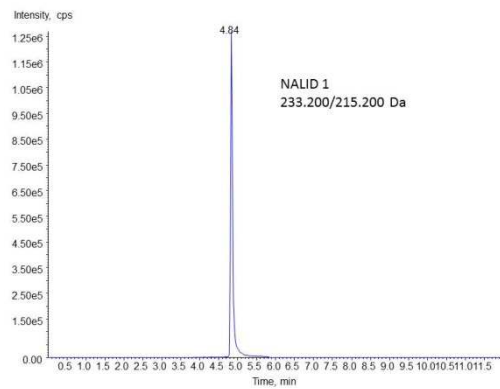
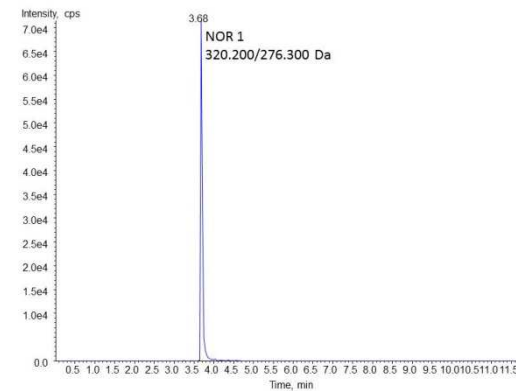
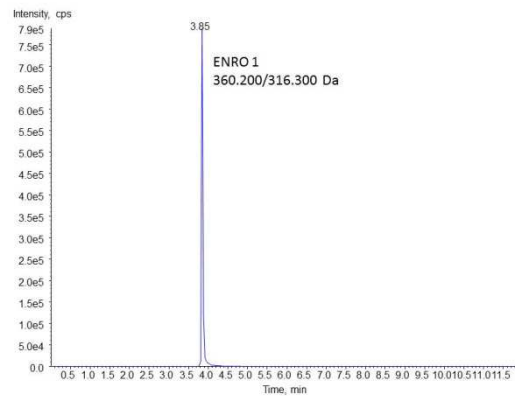
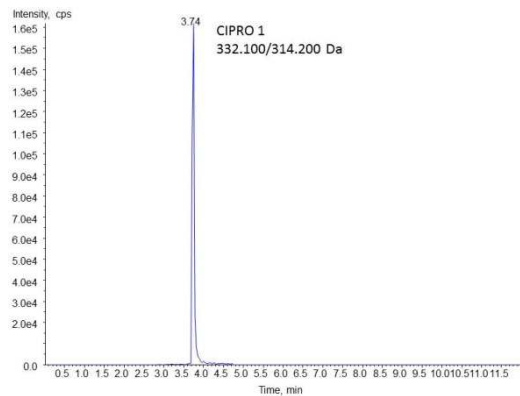


Figure 2.B. Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with quinolones mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

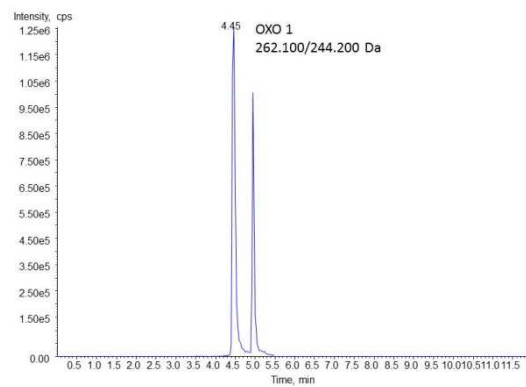
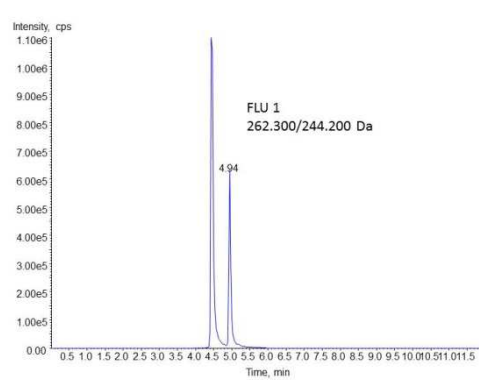


Figure 2.B. (Continue) Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with quinolones mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

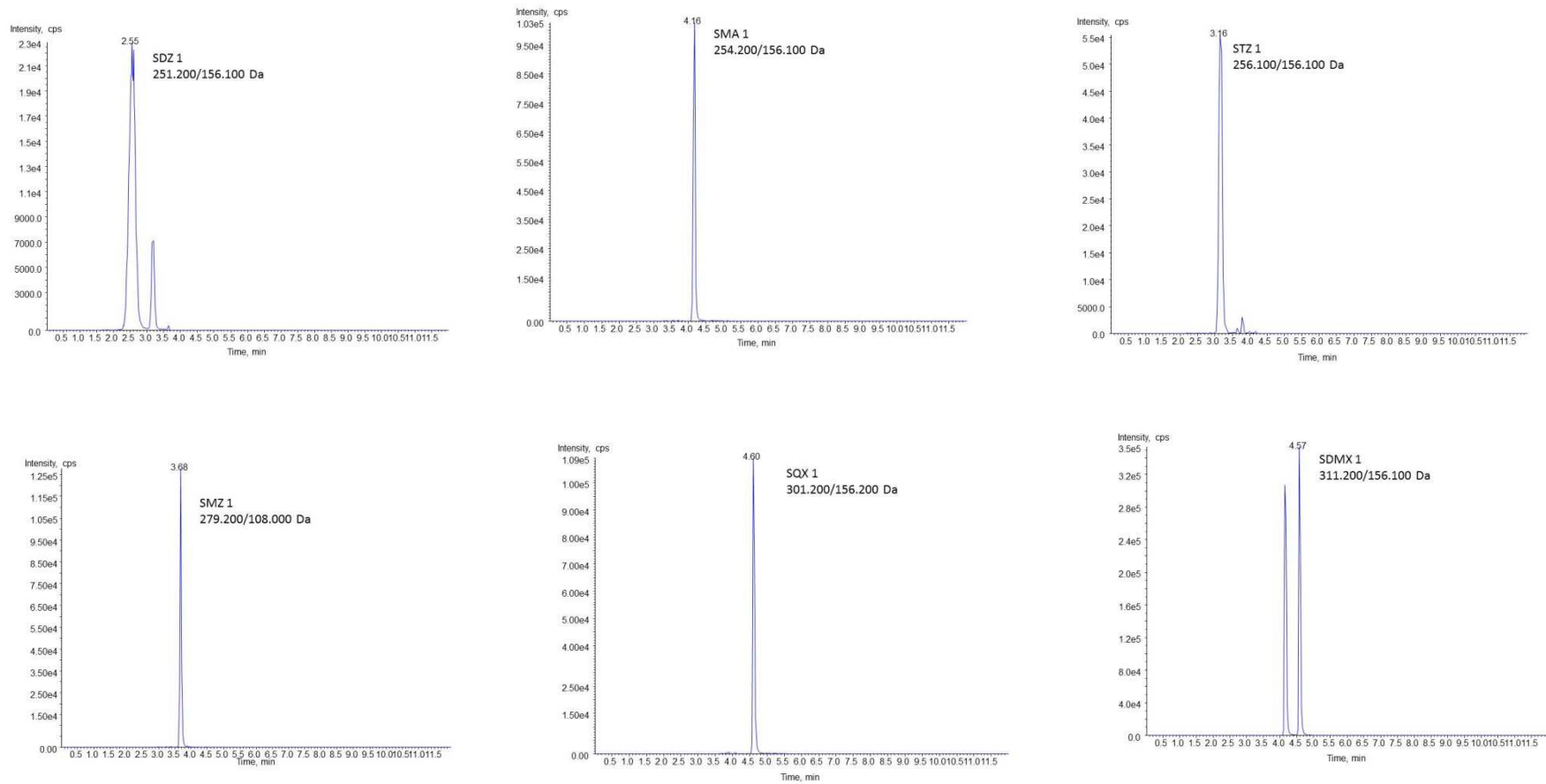


Figure 2.C. Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with sulfonamides mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

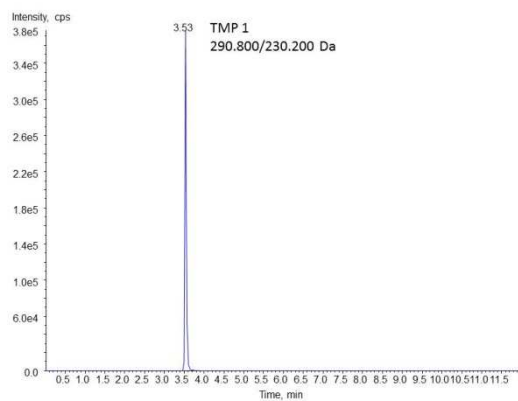
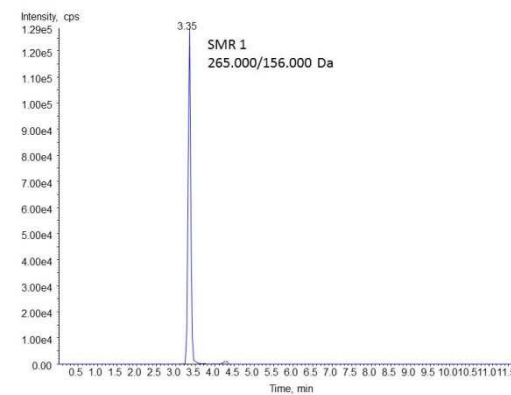
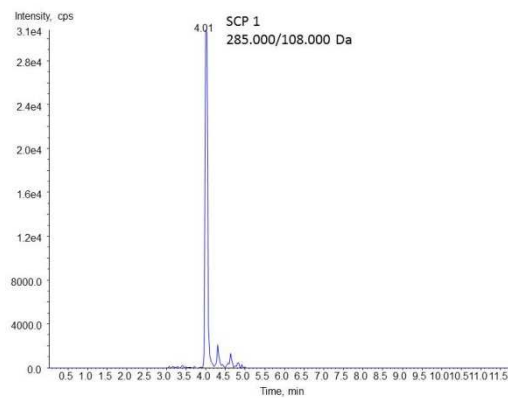
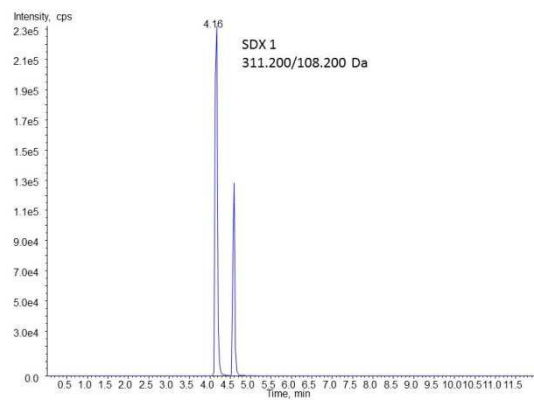


Figure 2.C. (Continue) Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with sulfonamides mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

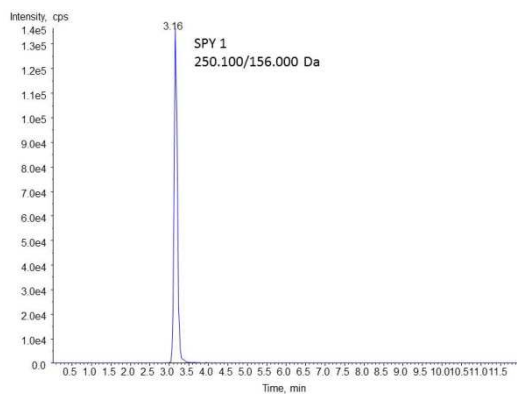
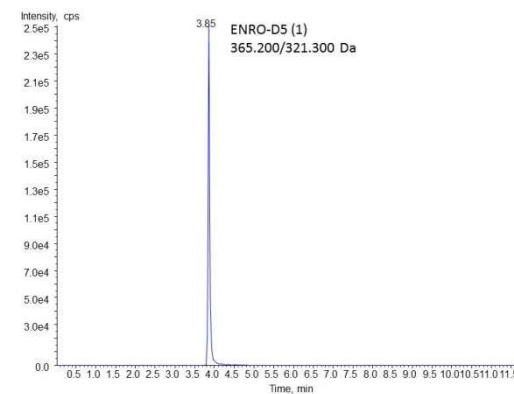
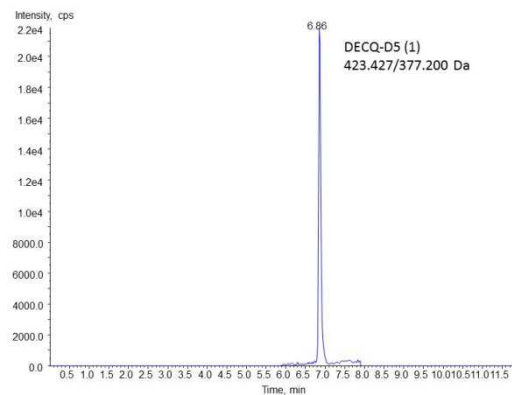
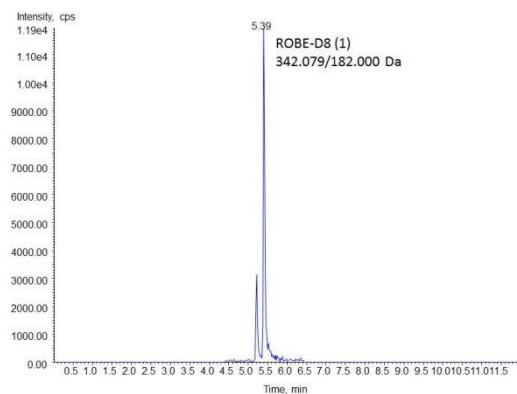


Figure 2.D. Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with internal standards mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Positive ionization mode (ESI+).

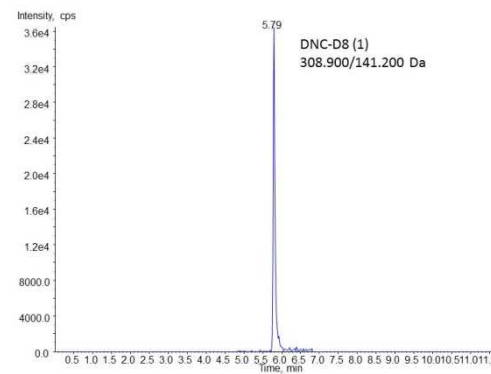
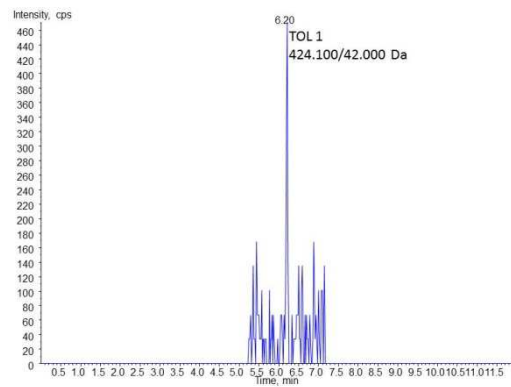
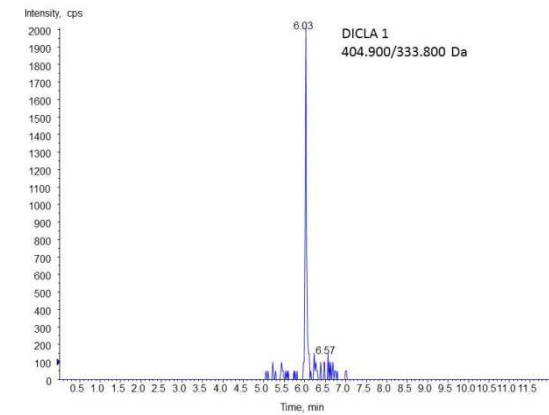
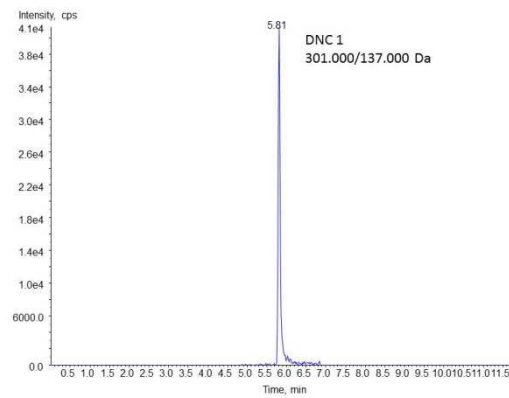
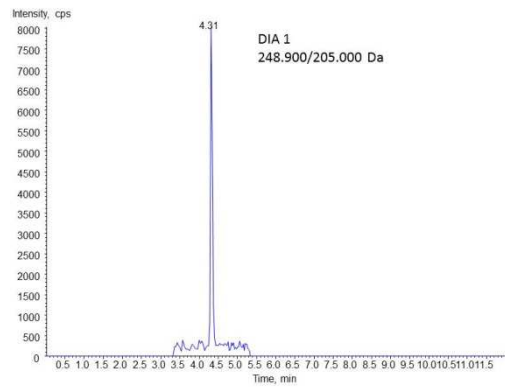


Figure 2.E. Ion chromatograms obtained from egg sample spiked with coccidiostatics and internal standards (DNC-D8) mixture in MRL/LVA level: peak quantification transition. Negative ionization mode (ESI-).

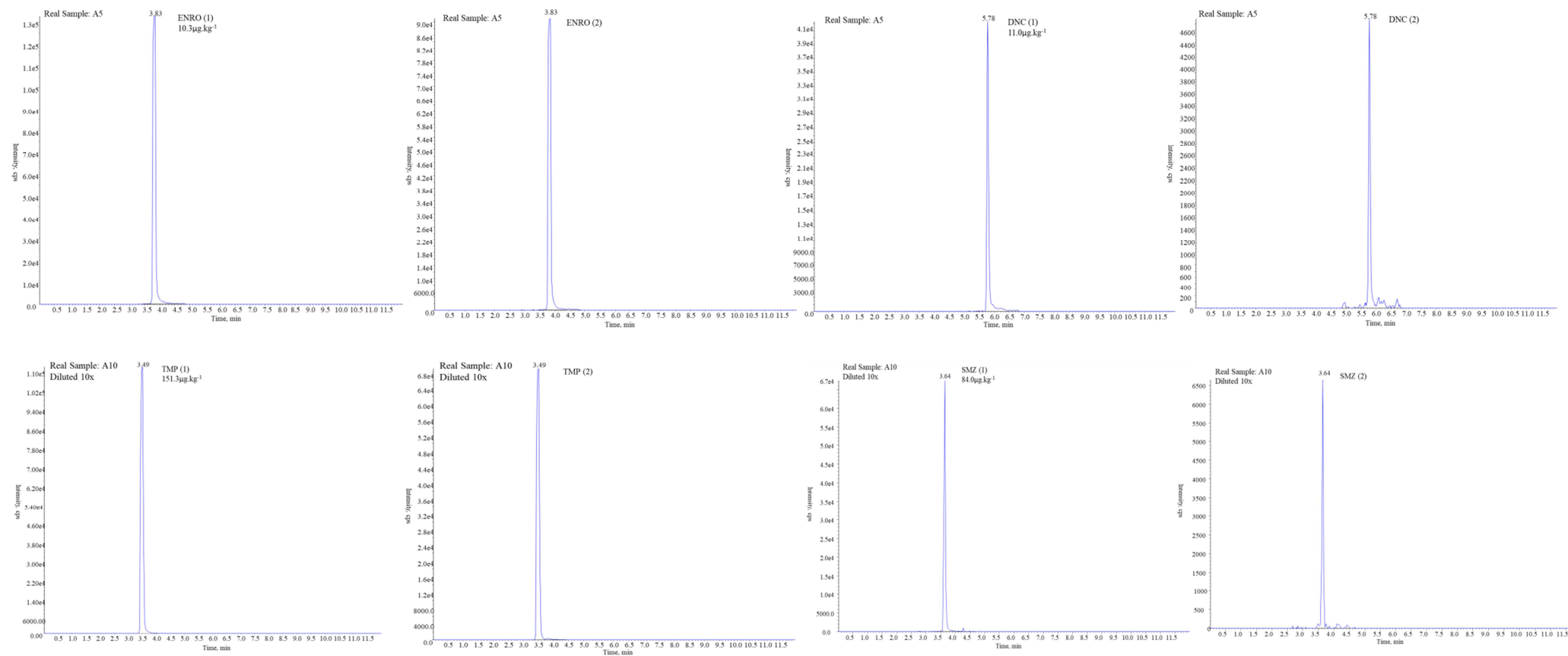


Figure 3. Ion chromatograms obtained from real sample (A5) quantified for enrofloxacin ($10.3\mu\text{g.kg}^{-1}$) and dinitrocarbanilide ($11.0\mu\text{g.kg}^{-1}$). And, ion chromatograms obtained from real sample (A10) quantified for trimethoprim ($151.0\mu\text{g.kg}^{-1}$) and sulfamethazine ($84.0\mu\text{g.kg}^{-1}$). (1) peak quantification transition (2) peak confirmatory transition.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

- Os resultados obtidos deste trabalho foram alcançados com êxito, cumprindo os objetivos geral e específicos.
- A metodologia multirresíduos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários pertencentes às classes dos coccidiostáticos, quinolonas e sulfonamidas por CLAE-EM/EM apresentou-se adequada para os parâmetros avaliados atendendo aos critérios da Diretiva Europeia (2002/657/EC) com aplicação do protocolo de validação de extensão de escopo.
- A metodologia multirresíduos desenvolvida e validada já está incluída no escopo de análises do PNCRC animal/MAPA, pelo LANAGRO/RS desde Julho de 2015 até a presente data.
- Os medicamentos veterinários que apresentaram maior ocorrência em ovos foram o enrofloxacino (40,78%), nicarbazina (22,33%), trimetoprima (5,83%) e sulfametazina (5,83%) no total de 391 amostras analisadas no PNCRC.

Dentre as perspectivas de desenvolvimento relacionadas a este trabalho podemos citar:

- Uso da metodologia desenvolvida para realização de estudos farmacocinéticos em aves de postura, incluindo o impacto de níveis residuais decorrentes de contaminação cruzada em plantas produtoras de alimentação para animais. Entre as primeiras opções está a avaliação do perfil residual dos compostos nicarbazina, enrofloxacino e ciprofloxacino em ovos.
- Aplicação da metodologia para caracterização de amostras contendo resíduos de MVs em ovos visando a produção de materiais de referência certificados de acordo com a Norma ISO Guia Série 34, para aplicação como amostras de controle de qualidade em laboratórios dentro do Brasil.
- Ampliação do escopo de compostos monitorados para outras classes de interesse, incluindo abordagens de triagem por LC-QTOF.
- Estudos de metabólitos.
- Avaliação da partição de antimicrobianos em gema e clara de ovo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1, p. 411–423, 30 out. 1992.

AGUILERA-LUIZ, M. M.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO FRENICH, A. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 6th International Conference on Water in Food. v. 132, n. 4, p. 2171–2180, 15 jun. 2012.

ALDRED, K. J.; KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565–1574, 18 mar. 2014.

ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Pharmaceutical-residue analysis**, v. 26, n. 6, p. 534–556, jun. 2007.

ANDRIOLE, V. T. The Quinolones: Past, Present, and Future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. Supplement 2, p. S113–S119, 15 jul. 2005.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVetANVISA**, , 2003.

BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIANSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 1–15, 30 nov. 2011.

BARRETO, F. **Identificação de Perfis Farmacocinéticos de Resíduos de Fármacos Antimicrobianos Utilizados na Produção de Frango de Corte**. Tese—Porto Alegre - RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas., 2014.

BARROW, P. A.; HASSAN, J. O.; LOVELL, M. A.; BERCHIERI, A. Vaccination of chickens with aroA and other mutants of Salmonella typhimurium and S. enteritidis. **Research in Microbiology**, v. 141, n. 7, p. 851–853, 1 set. 1990.

BERENDSEN, B. J. A.; STOLKER, L. (A.)A. M.; NIELEN, M. W. F.; NIELEN, M. W. F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Highlights in Sample Preparation (for Food and Environmental Analysis). v. 43, p. 229–239, fev. 2013.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: Their Effect on Production Efficiency and Mode of Action^{1,2}. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465–1483, 1984.

BŁADEK, T.; POSYNIAK, A.; GAJDA, A.; GBYLIK, M.; ZMUDZKI, J. Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in eggs by liquid chromatography-

tandem mass spectrometry. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 56, n. 3, p. 321–327, 2012.

BLANCHFLOWER, W. J.; KENNEDY, D. G. Determination of monensin, salinomycin and narasin in muscle, liver and eggs from domestic fowl using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 675, n. 2, p. 225–233, 26 jan. 1996.

BOGIALLI, S.; CIAMPANELLA, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A. Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 40, p. 6810—6815, out. 2009a.

BOGIALLI, S.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; TRAMONTANA, G. Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p. 794–800, 30 jan. 2009b.

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 947–966, 2009.

BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica Em Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 14, p. 3933–3940, 1 jul. 2004.

BOSCHER, A.; GUIGNARD, C.; PELLET, T.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 41, p. 6394–6404, 8 out. 2010.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 84–90, 14 dez. 2012.

CHAPMAN, H. D. A landmark contribution to poultry science—Prophylactic control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, v. 88, n. 4, p. 813–815, 1 abr. 2009.

CHEN, D.; YU, J.; TAO, Y.; PAN, Y.; XIE, S.; HUANG, L.; PENG, D.; WANG, X.; WANG, Y.; LIU, Z.; YUAN, Z. Qualitative screening of veterinary anti-microbial

agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1017–1018, p. 82–88, 1 abr. 2016.

CLARKE, L.; FODEY, T. L.; CROOKS, S. R. H.; MOLONEY, M.; O'MAHONY, J.; DELAHAUT, P.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. **Meat Science**, Advancing Beef Safety through Research and Innovation: Prosafebeef. v. 97, n. 3, p. 358–374, jul. 2014a.

CLARKE, L.; FODEY, T. L.; CROOKS, S. R. H.; MOLONEY, M.; O'MAHONY, J.; DELAHAUT, P.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. **Advancing Beef Safety through Research and Innovation: Prosafebeef**, v. 97, n. 3, p. 358–374, jul. 2014b.

CROSS JR, J. T. Fluoroquinolones. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 211–223, jul. 2001.

CUI, X.; SHAO, B.; ZHAO, R.; YANG, Y.; HU, J.; TU, X. Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs by ultra-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 15, p. 2355–2364, 15 ago. 2006.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 103–121, 23 jun. 2015.

DE ZOETE, M. R.; VAN PUTTEN, J. P. M.; WAGENAAR, J. A. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. **4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference**, v. 25, n. 30, p. 5548–5557, 26 jul. 2007.

DENG, X.-J.; YANG, H.-Q.; LI, J.-Z.; SONG, Y.; GUO, D.-H.; LUO, Y.; DU, X.-N.; BO, T. MULTICLASS RESIDUES SCREENING OF 105 VETERINARY DRUGS IN MEAT, MILK, AND EGG USING ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 19, p. 2286–2303, 15 nov. 2011.

DORNE, J. L. C. M.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; BERTELSEN, U.; RENSHAW, D. W.; PELTONEN, K.; ANADON, A.; FEIL, A.; SANDERS, P.; WESTER, P.; FINK-GREMMELS, J. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. **Risk assessment of undesirable substances in feed**, v. 270, n. 3, p. 196–208, 1 ago. 2013.

DOWLING, G.; O'KEEFFE, M.; SMYTH, M. R. Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 31–34, 10 maio 2005.

DRAISCI, R.; LUCENTINI, L.; BORIA, P.; LUCARELLI, C. Micro high-performance liquid chromatography for the determination of nicarbazin in chicken tissues, eggs, poultry feed and litter. **20th International Symposium on Chromatography**, v. 697, p. 407–414, 21 abr. 1995.

DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 504–508, 1 out. 1999.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 3, p. 377–392, set. 1997.

DUBREIL-CHÉNEAU, E.; BESSIRAL, M.; ROUDAUT, B.; VERDON, E.; SANDERS, P. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. **Hormones and Veterinary Drugs State-of-the-art and emerging technologies**, v. 1216, n. 46, p. 8149–8157, 13 nov. 2009a.

DUBREIL-CHÉNEAU, E.; BESSIRAL, M.; ROUDAUT, B.; VERDON, E.; SANDERS, P. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. **Hormones and Veterinary Drugs State-of-the-art and emerging technologies**, v. 1216, n. 46, p. 8149–8157, 13 nov. 2009b.

DUBREIL-CHÉNEAU, E.; PIROTAIS, Y.; VERDON, E.; HURTAUD-PESSEL, D. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: Validation according to European Union Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1339, p. 128–136, 25 abr. 2014.

FANG, G.-Z.; HE, J.-X.; WANG, S. Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1–2, p. 12–17, 15 set. 2006.

FDA, U. S. 2000N–1571. Withdrawal of Enrofloxacin for Poultry. U.S. Food & Drug Administration. . 27 jul. 2005.

FORTI, A. F.; SCORTICHINI, G. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Papers presented at EuroResidue VI**, v. 637, p. 214–219, 1 abr. 2009.

FREITAS, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Multidetecção de antibióticos em tecido de fígado por ultra-alta pressão-liquido-cromatografia-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 976–977, p. 49–54, 22 jan. 2015.

FUH, M.-R. S.; CHAN, S.-A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. **Talanta**, v. 55, n. 6, p. 1127–1139, 24 dez. 2001.

FURUSAWA, N.; HANABUSA, R. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. **Food Research International**, v. 35, n. 1, p. 37–42, 2002.

GAJDA, A.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; GBYLIK, M.; BLADE, T. Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 430–439, 2012.

GALARINI, R.; FIORONI, L.; ANGELUCCI, F.; TOVO, G. R.; CRISTOFANI, E. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. **Hormones and Veterinary Drugs State-of-the-art and emerging technologies**, v. 1216, n. 46, p. 8158–8164, 13 nov. 2009.

GALARINI, R.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; PETTINACCI, L.; DUSI, G. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. **Selected papers presented at the 6th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis Gent, Belgium, 1-4 June 2010 HVDA-2010**, v. 700, p. 167–176, 26 ago. 2011.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 355–366, 15 abr. 2010.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; SILVIA DÍAZ-CRUZ, M.; BARCELÓ, D.; BARCELÓ, D. Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. **Applying combinations of chemical analysis and biological effects to environmental and food samples - II**, v. 28, n. 6, p. 804–819, jun. 2009.

GARRIDO FRENICH, A.; AGUILERA-LUIZ, M. DEL M.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 150–160, 28 fev. 2010.

GENTILI, A.; PERRET, D.; MARCHESE, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **LC-Tandem MS**, v. 24, n. 7, p. 704–733, 2005.

GUARDABASSI, L.; B. JENSEN, L.; KRUSE, H.; LÖHREN, U.; RICCI, A.; S. CUMMINGS, T. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HAFEZ, H. Emerging and re-emerging bacterial diseases in poultry: a review. **Wiener tierärztliche Monatsschrift**, v. 90, n. 7, p. 174–181, 2003.

HAGREN, V.; PEIPPO, P.; TUOMOLA, M.; LÖVGREN, T. Rapid time-resolved fluoroimmunoassay for the screening of monensin residues in eggs. **Papers presented at the 2nd International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules SCM-2 2005** Papers presented at the 2nd International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules, v. 557, n. 1?2, p. 164–168, 31 jan. 2006.

HAMSCHER, G.; LIMSUWAN, S.; TANSAKUL, N.; KIETZMANN, M. Quantitative Analysis of Tylosin in Eggs by High Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: Residue Depletion Kinetics after Administration via Feed and Drinking Water in Laying Hens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 9017–9023, 1 nov. 2006.

HANSEN, M.; KROGH, K. A.; BRANDT, A.; CHRISTENSEN, J. H.; HALLING-SØRENSEN, B. Fate and antibacterial potency of anticoccidial drugs and their main abiotic degradation products. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 2, p. 474–480, fev. 2009.

HE, X.; TAN, L.; WU, W.; WANG, J. Determination of sulfadiazine in eggs using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 11, p. 2204–2212, 1 jun. 2016.

HELDENS, J. G. M.; PATEL, J. R.; CHANTER, N.; TEN THIJ, G. J.; GRAVENDIJK, M.; SCHIJNS, V. E. J. C.; LANGEN, A.; SCHETTERS, T. P. M. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. **The Veterinary Journal**, v. 178, n. 1, p. 7–20, out. 2008.

HELLER, D. N.; NGOH, M. A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M. H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 1, p. 39–52, 5 jul. 2002.

HELLER, D. N.; NOCHETTO, C. B. Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Silica SPE Cleanup and LC-MS/MS Analysis of Ionophore and Macrolide Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6848–6856, 1 nov. 2004.

HELLER, D. N.; NOCHETTO, C. B.; RUMMEL, N. G.; THOMAS, M. H. Development of Multiclass Methods for Drug Residues in Eggs: Hydrophilic Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Analysis of Tetracycline, Fluoroquinolone, Sulfonamide, and β -Lactam Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5267–5278, 1 jul. 2006.

HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, n. 1–2, p. 63–70, 26 jan. 2007.

HOFF, R. B.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M. DO C. R.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of sulfonamide antibiotics and metabolites in liver, muscle and kidney samples by pressurized liquid extraction or ultrasound-assisted extraction followed by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC–QqLIT-MS/MS). **Talanta**, v. 134, p. 768–778, 1 mar. 2015.

HUERTAS-PÉREZ, J. F.; ARROYO-MANZANARES, N.; HAVLÍKOVÁ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; SOLICH, P.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Method optimization and validation for the determination of eight sulfonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 261–266, 30 maio 2016.

HUET, A.-C.; CHARLIER, C.; TITTEMIER, S. A.; SINGH, G.; BENREJEB, S.; DELAHAUT, P. Simultaneous Determination of (Fluoro)quinolone Antibiotics in Kidney, Marine Products, Eggs, and Muscle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2822–2827, 1 abr. 2006.

IN 11 MAPA. IN11. Instrução Normativa N°11, de 5 de Maio de 2014. . 2014.

IN 26 MAPA, M. IN 26. Instrução Normativa N°26, de 09 de Julho de 2009. . jul. 2009.

INGERSLEV, F.; HALLING-SØRENSEN, B. Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2467–2473, 1 out. 2000.

JIMÉNEZ, V.; RUBIES, A.; CENTRICH, F.; COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 11, p. 1443–1451, 18 mar. 2011.

KIM, M.-S.; LIM, J.-H.; HWANG, Y.-H.; PARK, B.-K.; SONG, I.-B.; YUN, H.-I. Plasma disposition of toltrazuril and its metabolites, toltrazuril sulfoxide and toltrazuril sulfone, in rabbits after oral administration. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1?, p. 51–56, 19 abr. 2010.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MOLONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **Hormones and Veterinary Drugs State-of-the-art and emerging technologies**, v. 1216, n. 46, p. 7977–8015, 13 nov. 2009.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Micro**, v. 8, n. 6, p. 423–435, jun. 2010.

KUENZEL, W. J.; ABDEL-MAKSOU, M. M.; ELSASSER, T.; PROUDMAN, J. A. Sulfamethazine advances puberty in male chicks by effecting a rapid increase in gonadotropins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137, n. 2, p. 349–355, fev. 2004.

LI, G. .; KANU, S.; XIANG, F. .; XIAO, S. .; ZHANG, L.; CHEN, H. .; YE, H. . Isolation and selection of ionophore-tolerant Eimeria precocious lines: E. tenella, E. maxima and E. acervulina. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 261–276, 6 fev. 2004.

LOMBARDO-AGÜÍ, M.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L.; CRUCES-BLANCO, C. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. **Talanta**, v. 93, p. 193–199, 15 maio 2012.

LOPES, R. P.; DE FREITAS PASSOS, É. E.; DE ALKIMIM FILHO, J. F.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, D. V.; AUGUSTI, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 192–198, nov. 2012.

MACHINSKI JUNIOR, M.; BENINI, A.; NETTO, D. P.; NUNES, M. P.; VEDOVELLO FILHO, D.; BENATTO, A.; SCUCATO, E. S.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; LOPES, M. O.; BOSQUIROLI, S. L. **Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná**PAMvet/PR, , 2005.

MACLACHLAN, D. J.; MUELLER, U. A refined approach to estimate exposure for use in calculating the Maximum Residue Limit of veterinary drugs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 99–106, fev. 2012.

MAPA. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, , 2015.

MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 345–354, nov. 2001.

MCDUGALD, L. R.; SEIBERT, B. P. Residual activity of anticoccidial drugs in chickens after withdrawal of medicated feeds. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 91–99, 31 jan. 1998.

MOLONEY, M.; CLARKE, L.; O'MAHONY, J.; GADAJ, A.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue

using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, p. 94–104, 31 ago. 2012.

MORETTI, S.; DUSI, G.; GIUSEPPONI, D.; PELLICCIOTTI, S.; ROSSI, R.; SALUTI, G.; CRUCIANI, G.; GALARINI, R. Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 175–188, 15 jan. 2016.

MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; DELAHAUT, P. Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **4th International Symposium on Hormone and Veterinary Residue Analysis.**, v. 483, n. 1–2, p. 27–37, 25 abr. 2003.

MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; PETEGHEM, C. V. Determination of the coccidiostat diclazuril in poultry feed and meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **EURORESIDUE V, Noordwijkerhout, The Netherlands, 10-12 May 2004.**, v. 529, p. 229–234, 24 jan. 2005.

MULDER, P. P. J.; BALZER-RUTGERS, P.; TE BRINKE, E. M.; BOLCK, Y. J. C.; BERENDSEN, B. J. A.; GERÇEK, H.; SCHAT, B.; VAN RHIJN, J. A. Deposition and depletion of the coccidiostats toltrazuril and halofuginone in eggs. **EURORESIDUE V, Noordwijkerhout, The Netherlands, 10-12 May 2004.**, v. 529, n. 1?2, p. 331–337, 24 jan. 2005.

NAEEM, A.; BADSHAH, S. L.; MUSKA, M.; AHMAD, N.; KHAN, K. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 268, 2016.

NIKOLAIDOU, K. I.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Seven Tetracycline Antibiotics Residues in Chicken Muscle and Egg Yolk According to 2002/657/EC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 14, p. 2141–2158, 14 jul. 2008.

OVCHINNIKOV, Y. A. Physico-chemical Basis of Ion Transport through Biological Membranes: Ionophores and Ion Channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 94, n. 2, p. 321–336, 1979.

PAINTER, G. R.; POLLACK, R.; PRESSMAN, B. C. Conformational dynamics of the carboxylic ionophore lasalocid A underlying cation complexation-decomplexation and membrane transport. **Biochemistry**, v. 21, n. 22, p. 5613–5620, 1 out. 1982.

PETERS, R. J. B.; BOLCK, Y. J. C.; RUTGERS, P.; STOLKER, A. A. M.; NIELEN, M. W. F. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. **Hormones and Veterinary DrugsState-of-the-art and emerging technologies**, v. 1216, n. 46, p. 8206–8216, 13 nov. 2009.

PIATKOWSKA, M.; JEDZINIAK, P.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, Part A, p. 571–580, 15 abr. 2016.

PIKKEMAAT, M. G.; MULDER, P. P. J.; ELFERINK, J. W. A.; DE COCQ, A.; NIELEN, M. W. F.; VAN EGMOND, H. J. Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 8, p. 842–850, 1 ago. 2007.

PREMARATHNE, J. M. K. J. K.; SATHARASINGHE, D. A.; GUNASENA, A. R. C.; MUNASINGHE, D. M. S.; ABEYNAYAKE, P. Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and eggs by high-performance liquid chromatography. **Food Control**, 11 dez. 2015.

PRESSMAN, B. C. Biological Applications of Ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 501–530, 1 jun. 1976.

QIAN, M.; WU, H.; WANG, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; LIN, H.; MA, J. Occurrence of trace elements and antibiotics in manure-based fertilizers from the Zhejiang Province of China. **Science of The Total Environment**, v. 559, p. 174–181, 15 jul. 2016.

RIBEIRO, C. C.; ORLANDO, R. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Electric field-assisted solid phase extraction and cleanup of ionic compounds in complex food matrices: Fluoroquinolones in eggs. **Talanta**, v. 152, p. 498–503, 15 maio 2016.

RIDDELL, F. G. Structure, conformation, and mechanism in the membrane transport of alkali metal ions by ionophoric antibiotics. **Chirality**, v. 14, n. 2–3, p. 121–125, 1 jan. 2002.

ROCHA SIQUEIRA, S. R.; LUIZ DONATO, J.; DE NUCCI, G.; REYES, F. G. R. A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine and bovine using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 23–24, p. 4012–4019, 1 dez. 2009.

ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, n. 5, p. 470–478, 1 maio 2006.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725–759, out. 2006.

SARRO, A. D.; SARRO, G. D. Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. **Curr Med Chem**, v. 8, 2001.

SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, n. 2, p. 174–181, 8 ago. 2005.

SHAO, B.; WU, X.; ZHANG, J.; DUAN, H.; CHU, X.; WU, Y. Development of a Rapid LC–MS–MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken. **Chromatographia**, v. 69, n. 9, p. 1083–1088, 2009.

SHARMAN, P. A.; SMITH, N. C.; WALLACH, M. G.; KATRIB, M. Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 8, p. 590–598, 1 ago. 2010.

SKOOG, D. .; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos d Química Analítica**. 8^a ed. [s.l.] Editora Thomson, 2006.

SOUSA, D. A. DE; TARGA, M. M.; BARRETO, F.; HOFF, R. B. Avaliação da Ocorrência de Antimicrobianos em Rações para Alimentação Animal no Período de 2012-2013. **Avaliação da Ocorrência de Antimicrobianos em Rações para Alimentação Animal no Período de 2012-2013**, Congresso Brasileiro de Toxicologia. n. XVII, 2013.

SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. Á.; DA COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; DA NÓBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, p. 82–92, 3 dez. 2010.

STOLKER, A. A. M.; ZUIDEMA, T.; NIELEN, M. W. F.; NIELEN, M. W. F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 967–979, nov. 2007.

SUKUL, P.; SPITELLER, M. Sulfonamides in the Environment as Veterinary Drugs. In: WARE, G. W. (Ed.). . **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews**. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 67–101.

TARBIN, J. .; CLARKE, P.; SHEARER, G. Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography–mass-selective detection and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 729, n. 1–2, p. 127–138, 11 jun. 1999.

THIELE-BRUHN, S. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. **Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review**, p. 145–167, Abril 2003.

VALDERAS, M. W.; ANDI, B.; BARROW, W. W.; COOK, P. F. Examination of intrinsic sulfonamide resistance in *Bacillus anthracis*: A novel assay for

dihydropteroate synthase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, n. 5, p. 848–853, maio 2008.

WANG, J.; LEUNG, D. Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 19, p. 3213–3222, 15 out. 2007.

WANG, X.; LI, K.; SHI, D.; XIONG, N.; JIN, X.; YI, J.; BI, D. Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Test Strip for Rapid Detection of Sulfonamides in Eggs and Chicken Muscles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2072–2078, 1 mar. 2007.

WON, S. Y.; LEE, C. H.; CHANG, H. S.; KIM, S. O.; LEE, S. H.; KIM, D. S. Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1101–1107, jul. 2011.

YAKKUNDI, S.; CANNAVAN, A.; YOUNG, P. .; ELLIOTT, C. .; KENNEDY, D. . Halofuginone contamination in feeds as a cause of residues in eggs. **Papers presented at the 4th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis Antwerp, Belgium, 4-7 June 2002. Part I**, v. 473, p. 177–182, 25 nov. 2002.

YANG, S.; CHA, J.; CARLSON, K. Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 18, p. 2131–2145, 30 set. 2004.

YU, H.; TAO, Y.; CHEN, D.; WANG, Y.; HUANG, L.; PENG, D.; DAI, M.; LIU, Z.; WANG, X.; YUAN, Z. Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 25, p. 2653–2662, 1 set. 2011.

ZHANG, Z.; LI, X.; DING, S.; JIANG, H.; SHEN, J.; XIA, X. Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 204, p. 252–262, 1 ago. 2016.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of Salmonella in poultry. **Vaccine**, v. 17, n. 20–21, p. 2538–2545, 4 jun. 1999.

ZHENG, M.-M.; ZHANG, M.-Y.; PENG, G.-Y.; FENG, Y.-Q. Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 2, p. 160–172, 12 set. 2008.

9. APÊNDICE

Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Agarwal,1992	Sulfonamidas	Sulfanilamida, sulfadiazina, sulfatiazole, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametiazole, sulfametazina, sulfacloropiridazina, suladimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfaguanidina, sulfadoxina, sulfaacetamida, sulfametoxazole, sulfisoxazole e sulfamonometoxina.	16	Músculo, leite e ovos	CLAE-UV
Draisci et al.,1995	Coccidiostático	Nicarbazina	1	Músculo de frango, ovos, ração e <i>litter</i>	CLAE
Blanchflower & Kennedy,1996	Ionóforos	Monensina, narasina e salinomicina.	3	Fígado e ovos	CL-EM
Tarbin et al., 1999	Sulfonamidas	Sulfaclorpiridazina, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfadiazina, sulfaguanidina, sulfisomidina, sulfameter, sulfamonometoxina, sulfamoxol, sulfametoxipiridazina, sulfamerazina, sulfametizole, sulfametazina, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, sulfaquinoxalina e sulfatiazol.	17	Ovos	CG-EM e CL-EM
Matabudul et al.,2001	Ionofóros	Lasalocida, monensina, narasina e salinomicina	4	Tecido animal e ovos	CL-EM/EM
Heller et al.,2002	Sulfonamidas	Sulfaguanidina, sulfanilamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfametazina, sulfametiazol, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfisoxazole, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.	15	Ovos	CL-EM/EM (Confirmatório) e CL-UV(Quantitativo)
Yakkundi et al.,2002	Coccidiostático	Halofuginona	1	Ovos	CL-EM/EM
Bogialli et al.,2003	Sulfonamidas		12	Leite e ovos	CL-EM (Confirmatório)
Hamscher et al.,2003	Pesticida	Propoxur	1	Ovos	CL- Detector de Arranjo Diodo (DAD)
Mortier et al.,2003	Coccidiostáticos	Diclazuril, dimetridazole, halofuginona, robenidina e nicarbazina.	5	Ovos	CL-EM/EM
Schneider & Donoghue,2003	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, enrofloxacino, danofloxacino, difloxacino, norfloxacino e orbifloxacino.	6	Ovos (gema, clara e total)	CL-DF-EM

Continuação da Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Heller & Nochetto, 2004	Ionofóros	Lasalocida, monensina, salinomicina e narasina.	4	Ovos	CL-EM/EM
	Macrolídeos	Eritromicina e tilosina.	2		
Dowling et al., 2005	Coccidiostático	Robenidina	1	Ovos	CL-UV
Liu Tiezheng et al., 2005	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazole, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.	7	Ovos	CL
Mortier et al., 2005	Coccidiostáticos	Diclazuril, halofuginona, robenidina, nicarbazina, dimetridazole e 2-hidroxidimetridazol.	6	Ovos e ração	CL-EM/EM
Mulder et al., 2005	Coccidiostáticos	Toltrazuril e halofuginona	2	Ovos	CL-EM/EM
Cui et al., 2006	Corticoide	Glucocorticoíde	17	Leite e Ovos	CL-EM/EM
Fang et al., 2006 (nanotubes)	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazole, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.	10	Ovos e suíno	CL
Hagren et al., 2006	Ionofóro	Monensina	1	Ovos	Fluoroimunoensaio
Hamscher et al., 2006	Macrolídeos	Tilosina	1	Ovos	CL-EM/EM (Cinética)
Heller et al., 2006	Tetraciclina, fluoroquinolonas, sulfonamidas e β - lactâmicos			Ovos	CL-EM/EM
Huang et al., 2006	Cloramfenicóis			Mel, leite e ovos	CL-EM/EM
Huet et al., 2006	Fluoroquinolonas	Sarafloxacino, norfloxacino, difloxacino, ciprofloxacino, pefloxacino, ofloxacino, cinoxacino, danofloxacino, enrofloxacino, marbofloxacino, lomefloxacino, enoxacino, flumequina, ácido oxolínico e ácido nalidíxico.	15	Rim de suíno, ovos, músculo de frango, peixe e camarão	ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
Rokka & Peltonen, 2006	Coccidiostáticos	Lasalocida, monensina, salinomicina e narasina.	4	Ovos e músculo de frango	CL-EM/EM

Continuação da Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Herranz et al.,2007	Fluroquinolonas	Enroflocacino, ciprofloxacino e sarafloxacino.	3	Ovos	CL-EM/EM e CL-DFL (Extração líquida por pressurização ou Pressurized liquid extraction(PLE))
Pikkemaat et al.,2007	Quinolonas	Enrofloxacino, difloxacino, danofloxacino, flumequina e ácido oxolínico.	5	Ovos e músculo de frango	Screening microbiológico melhorado versus CL-EM/EM
Wang & Leung, 2007	Macrolídeos	Tilosina, tilosina B ou desmycosin, tilmicosina, eritromicina A, roxitromicina, oleandomicina, neospiramicina I e espiramicina I.	6	Ovos, leite e mel	CLAE/Q-TofMS e CL-EM/EM
Wang et al., 2007	Sulfonamidas	Sulfamonometoxina, sulfametoxidiazina, sulfadimetoxina e sulfadiazina.	4	Ovos e músculo de frango	Imunocromatografica de fluxo lateral
Nikolaidou et al., 2008	Tetraciclina	Minociclina, tetraciclina, oxitetraciclina, methaciclina, demeclociclina, chlortetraciclina e doxiciclina.	7	Ovos e músculo de frango	CL
Bogialli et al.,2009	Macrolídeos	Erithromicina A, tilosina e tilmicosina.	3	Ovos	CL-EM/EM
Cronly et al.,2009	Nitroimidazoles	Metronidazol, dimetridazol, ronidazol, ipronidazol e metabólito hidroxil de metronidazol hidroxil, HMMNI(hidroximetil, metil nitroimidazol), ipronidazol hidroxil, carnidazol, ornidazol, tinidazol e ternidazol.	11	Ovos	CL-EM/EM
Forti e Scortichini, 2009	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfatiazol,sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazin, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina.	10	Ovos	CL-EM/EM
Rocha Siqueira et al.,2009	Anfenicol	Cloramfenicol	1	Ovos, músculo de frango, suíno e bovino, camarão e peixe.	

Continuação da Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Shao et al., 2009	Coccidiostáticos	Maduramicina, salinomicina, monensina A, lasalocida, halofuginona, robenidina, etopabato, diaveridina, ronidazol, metronidazol, dimetridazol, amprolio, diclazuril e nicarbazina.	14	Ovos e músculo de frango	CL-EM/EM
Kim et al., 2010	Fluroquinolonas	Marbofloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, sarafloxacino, difloxacino, ácido oxolínico, ácido nalidíxico e flumequina.	10	Ovos	CL-DF e CL-EM/EM (confirmação)
Spisso et al., 2010	Ionofóros polieter	Lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina.	6	Ovos	CL-EM/EM
	Macrolídeos	Eritromicina, tilosina e claritromicina.	3		
	Lincosamidas	Lincomicina	1		
Ai et al., 2011	Coccidiostáticos	Diclazuril, toltrazuril e metabólitos (toltrazuril sulphoxide and toltrazuril sulphone).	4	Ovos e músculo de frango	Gel Permeation Chromatography (GPC)-EM/EM
Jiménez et al., 2011	Sulfonamidas	Sulfadimetoxina, sulfapiridina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfadiazina, sulfametazina, sulfadoxina, sulfamonometoxizina, sulfametoxipiridazina e sulfaclopiridazina.	14	Ovos	CL-EM/EM
	Derivados diaminopiridina	Trimetropima	1		
	Quinolonas	Sarafloxacino, norfloxacino, marbofloxacino, danofloxacino, difloxacino, flumequina, ácido oxilínico, ciproxacino e enrofloxacino	9		
	Tetraciclina	Oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina.	4		
	Macrolídeos	Tilosina, espiramicina, eritromicina, josamicina e tilmicocina.	5		
	Penicilinas / Lincosamidas	Amoxicilina, ampicilina, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina./Lincomicina	7/1		

Continuação da Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Capriotti et al.,2012	Tetraciclina	Clortetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina.	3	Ovos	CL-EM/EM
	Ionofóros	Maduramicina	1		
	Coccidiostáticos	Robenidina	1		
	Penicilinas	Ampicilina, amoxicilina e oxacilina	3		
	Cefalosporinas	Cefapirina e cefalexina	2		
	Fluoroquinolonas	Danofloxacino e enrofloxacino	2		
	Sulfonamidas	Sulfaguanidina, sulfametoxazol e sulfameter	3		
	Micotoxinas	Enniatins (A,A1 e B1), beauvericin, ochratoxins e aflatoxins	6		
Gadja et al.,2012	Fluroquinolonas	Marbofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, sarafloxacino, difloxacino, ácido nalidixíco, ácido oxoliníco e flumequina.	9	Ovos	CL-DF e CL-EM/EM
Dasenaki &Thomaidis, 2015	Quinolonas; Tetraciclina; Cefalosporinas; Penicilinas; Macrolídeos; Sulfonamidas; Benzimidazóis; Nitroimidazóis Coccidiostáticos; Outros antihelmínticos Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) Anfencíóis ; Beta agonistas; Beta bloqueadores ; Esteróides Analgésicos; Diuréticos; <i>Statins</i> ; Drogas antiepiléticas Drogas antiucera; <i>Fibrates</i>	Vide referência, Tabela 2.	115	Leite, manteiga, peixe e ovos	CL-EM/EM

Continuação da Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Chen et al.,2016	Fluroquinolonas	Vide referência, Tabela 1.	120	Músculo de frango, leite e ovos	CL-EM/EM (<i>Screening</i> qualitativo)
	Macrolídeos				
	β-lactâmicos				
	Sulfonamidas				
	Nitroimidazóis				
	Lincomicinas				
	Clorambenicóis				
	Quinoxalinas				
	Tetraciclinas				
	Polipeptídeos				
	Antimicrobianos Sinérgicos				
He et al.,2016	Sulfonamida	Sulfadiazina	1	Ovos	Extração em fase sólida com impressão molecular acoplado com CL.
Huertas-Pérez et al.,2016	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfaclopiridazine, sulfametoxazol, sulfadoxina e sulfadimetoxina.	8	Músculo de frango e ovos.	Extração em fase sólida com impressão molecular acoplado com CL.
Piatkowska et al.,2016	Tetraciclinas	Vide referência, Tabela 1.	6	Ovos	CL-EM/EM
	Fluroquinolonas		11		
	Sulfonamidas		17		
	Nitroimidazóis		9		
	Amfenicóis		3		
	Cefalosporinas		7		
	Coccidiostáticos		14		
	Macrolídeos / Penicilinas		8/8		
	Benzimidazóis		20		
	Inseticidas		3		
Corantes	12				
Lincosamida / Pleuromutilina	1/1				
Quimoterápico; Aminoglicosídeos	1;10				

Continuação da Tabela 4: Revisão bibliográfica de metodologias aplicadas à matriz ovo.

Referência	Classes	Compostos	Quantidades	Matrizes	Técnicas
Ribeiro et al., 2016	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, enrofloxacino, danofloxacino e sarafloxacino	4	Ovos	CLAE-EM/EM (Extração em fase sólida assistida por campo elétrico)
Zhang et al., 2016		Acetanilida, pentilenetetrazol, fencetina e tetrametrina.	4	Músculo de suíno, leite e ovos	LC-EM/EM
Premarathne et al., 2016	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfapiridina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfatiazol, sulfamerazina e sulfametizol.	7	Músculo de frango e ovos	LC-EM/EM

