

## **VII-003 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TILOSINA EM RESÍDUO AVÍCOLA**

**Aline Gomes de Oliveira Paranhos<sup>(1)</sup>**

Graduada em Química Industrial pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Doutoranda em Engenharia Ambiental pela UFOP.

**Andressa Rezende Pereira**

Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Mestra e doutoranda em Engenharia Ambiental pela UFOP.

**Silvana de Queiroz Silva**

Graduação em Ciências Biológicas pela UFSCar. Mestra em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC/USP). Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Essex e Natural History Museum, Londres. Professor Adjunto III Do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

**Sergio Francisco de Aquino**

Bacharel/Licenciado em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Doutor em Engenharia Química pelo Imperial College London. Professor adjunto do Departamento de Química (DEQUI) da UFOP.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental. Departamento de Química. Universidade Federal de Ouro Preto, campus Morro do Cruzeiro, s/n. Ouro Preto/MG. CEP: 3540-000 – Brasil. Tel: (31) 3559 2554 – e-mail: [aline.paranhos@aluno.ufop.edu.br](mailto:aline.paranhos@aluno.ufop.edu.br)

### **RESUMO**

A crescente demanda por carne de frango no Brasil incentiva o investimento, por parte dos produtores de aves, em medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia, como antibióticos e antimicrobianos, a fim de assegurar a qualidade e competitividade de seus produtos. Um dos antibióticos mais utilizados é a tilosina, o qual atua como promotor de crescimento na fase final de desenvolvimento dos frangos e, auxilia ainda no tratamento de enterite necrótica e no tratamento e prevenção de doenças respiratórias crônicas. Uma vez inserido no organismo animal, o antibiótico pode não ser totalmente metabolizado, podendo ser detectado em sua forma original, na carne do animal ou em matrizes ambientais. A detecção e quantificação de antibióticos, seja veterinários ou de uso humano, em águas, sedimentos, solos ou resíduos animais consiste em uma preocupação emergente e, na grande maioria das vezes, depende do desenvolvimento de métodos de extração do antibiótico da matriz complexa e de métodos analíticos para quantificação em altas e baixíssimas concentrações. O presente trabalho apresenta uma metodologia rápida e eficiente de extração do antibiótico tilosina em amostras de cama de aviário. Os métodos analíticos desenvolvidos e descritos neste trabalho foram validados segundo normativas da ANVISA e do MAPA. A análise de amostras de cama de aviário de empresa produtora de frangos de corte, situada em Minas Gerais, demonstra a adequação dos métodos desenvolvidos, os quais detectaram  $19,18 \pm 1,17 \text{ ng.L}^{-1}$  tilosina ( $1,53 \pm 0,09 \text{ g.ton}^{-1}$ ) em cama de aviário de galpão contendo aves na fase de recria e  $32,96 \pm 3,29 \text{ ng.L}^{-1}$  tilosina ( $2,64 \pm 0,26 \text{ g.ton}^{-1}$ ) em cama de aviário de galpão contendo aves na fase de produção.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tilosina, cama de aviário, resíduo avícola, método analítico, HPLC.

### **INTRODUÇÃO**

O Brasil é atualmente o 2º maior exportador de carnes no mundo, tendo sido responsável por 20,2% do total de carnes exportados em 2016. Além disso, o país é o 2º maior produtor de carne bovina, 3º em carne de frango e 4º em carne suína, o que representa 10,4% de participação no cenário mundial e equivaleu a 26 milhões de toneladas de carnes produzidas em 2016 (IBGE, 2016). Nesse cenário, destaca-se a produção de carne de frango, com cerca de 1,1 bilhões de cabeças produzidas em 2014. Isso se deve, principalmente, em função da mudança de hábito de consumo de carne no Brasil, que deixou de ser um país essencialmente consumidor de

carne bovina e passou a ser consumidor de carne de frango, visto o consumo per capita atingido em 2014, equivalente a 41,8 kg/hab/ano (ABPA, 2016).

De forma a atender a expectativa do mercado brasileiro concomitante aos incentivos governamentais, os produtores de aves investem em medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia, como antibióticos e antimicrobianos, a fim de assegurar a qualidade e competitividade de seus produtos. Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza o uso de 17 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum para diversas espécies animais, como bovinos, suínos e aves (PALERMO-NETO et al. 2006). A tilosina, especificamente, é um dos 17 compostos antimicrobianos autorizados pelo MAPA e um dos antibióticos mais amplamente consumidos como promotores de crescimento na fase final de desenvolvimento dos frangos e, auxilia ainda no tratamento de enterite necrótica, causada por *Clostridium perfringens*, e no tratamento e prevenção de doenças respiratórias crônicas, causadas *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, em frangos e perus de corte (MAM, 2014).

Uma vez inseridos no organismo animal via alimentação, muitos desses antibióticos não são totalmente metabolizados, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizada (SARMAH, MEYER, E BOXALL 2006). Assim, a utilização da cama de aviário – principal resíduo gerado na avicultura - em áreas usadas pela agricultura, seguido pelo escoamento superficial, constituem as principais vias de entrada desses compostos no ambiente terrestre e aquático (KEMPER 2008). Diversos estudos recentes sobre o tema, tem detectado a presença dessas substâncias, em baixas concentrações ( $\text{ng.L}^{-1}$  a  $\text{mg.L}^{-1}$ ), em diferentes amostras ambientais, como água, solo, sedimentos e excreta de animais (LEAL et al. 2012; MARTÍNEZ-CARBALLO et al. 2007; OK et al. 2011; PINHEIRO et al. 2013; ZHAO, DONG, E WANG, 2010).

Em relação à saúde humana, o maior problema relacionado à ocorrência desses compostos no ambiente é o aumento de cepas resistentes aos antibióticos e a possibilidade de contaminação cruzada (KEMPER 2008). Esse tipo de preocupação emergente se encaixa dentro do conceito de Saúde Única (do inglês: *One Health*), que trata da integração entre saúde humana, saúde animal, ambiente e adoção de políticas públicas efetivas na prevenção e controle de enfermidades, e tem motivado o desenvolvimento de diversas pesquisas envolvendo a identificação e quantificação de antimicrobianos em alimentos, como carne (HORIE et al. 1998), mel (THOMPSON et al. 2003) e ovos (SPISSO et al. 2010) e matrizes ambientais, como lodos ativados (PRADO, OCHOA, E AMRANE 2009) e resíduos animais (ANGENENT et al. 2008; LOKE et al. 2000; STONE, CLAY, E SPELLMAN, 2010; TEETER E MEYERHOFF, 2003).

Das metodologias de extração geralmente utilizadas, a grande maioria envolve o uso de cartuchos para extração em fase sólida (SISMOTTO, AUGUSTO, & PASCHOAL, 2013). O custo ligeiramente elevado pode ser um fator que inviabiliza a rotineira aplicação dessa metodologia. A técnica Extração Sólido-Líquido com Partição a Baixa Temperatura – ESLPBT tem se mostrado uma técnica fácil, rápida e eficiente na extração de antibióticos em matrizes complexas, além do menor custo quando comparada à utilização de cartuchos. Em relação à quantificação, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis é uma técnica precisa quando aplicada na análise de altas concentrações do analito. Entretanto, em baixas concentrações, na ordem de ppb, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas tem se mostrado a técnica mais precisa e confiável.

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar metodologia de análise e quantificação do antibiótico veterinário tilosina extraída de matrizes complexas de cama de aviário via ESLPBT, em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV-Vis (HPLC-UV) para elevadas concentrações, e em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) para baixas concentrações.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Condições cromatográficas**

As separações cromatográficas foram realizadas em HPLC Shimadzu (LC-20AD) equipado com detector UV-Vis (SPD-20A), quando usado para análise de altas concentrações de tilosina, e HPLC Shimadzu (modelo

8040) equipado com espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, quando usado para quantificação de baixas concentrações de tilosina. As especificações dos dois métodos de análise otimizados encontram-se na Tabela 1.

Para o preparo das soluções estoque, 0,025g e 2,5 g de tartarato de tilosina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) foram adequadamente pesados e dissolvidos em 25 mL de acetonitrila (J.T.Backer - Phillipsburg, NJ, USA), de forma a obter as concentrações de 1 mg.L<sup>-1</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para a construção da curva de calibração, alíquotas das duas soluções estoque (5, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µL) foram transferidas quantitativamente para vials de 1 mL e o volume completado com acetonitrila.

**Tabela 1: Parâmetros cromatográficos otimizados para os dois métodos de análise**

Parâmetros	Método 1: HPLC-UV	Método 2: HPLC-MS
Eluição	Isocrática	Isocrática
Fase Móvel	Acetonitrila:água (90:10)	Acetonitrila / ácido fórmico (1%)
Coluna	Poroshell 120 EC-C <sub>18</sub> (4 µm, 100x4.6 mm)	Poroshell 120 EC-C <sub>18</sub> (4 µm, 100x4.6 mm)
Fluxo	1,0 mL.min <sup>-1</sup>	0,2 mL.min <sup>-1</sup>
Comprimento de onda	280 nm	-
Linha de dessolvatação (DL)	-	250 °C
Heat Block (HB)	-	400 °C
Volume de injeção	10 µL	10 µL
Temperatura do forno	35°C	35°C
Tempo de retenção	1,461 minutos	5,641 minutos
Tempo de corrida	5,0 minutos	9,0 minutos
Íon precursor m/z	-	196,40
Íon produto m/z	-	173,65
Curva de calibração	0,5 – 100 mg.L <sup>-1</sup>	5 – 100 ng.L <sup>-1</sup>

#### Extração do analito e validação dos métodos

Inicialmente, para o preparo de amostras, 1,0 g de esterco de aves contendo 9,87 ± 1,12 % de umidade (Balança Ohaus MB25) e 0,8 g de NaCl foram adequadamente pesados (Marca: Shimadzu AUX220) em frascos âmbar de 12 mL. Procedeu-se com a agitação dos frascos em vórtex (Marca: Warmnest) a 2800 rpm durante 1 minuto para homogeneização da amostra. Adicionou-se então 8,0 mL de acetonitrila e agitou-se em vórtex a 2800 rpm durante 5 minutos. Guardaram-se as amostras em freezer (-16°C) durante período superior a 16h durante a noite. Logo após, retirou-se alíquota de 2 mL do sobrenadante e centrifugou-se (Marca: Eppendorf) a 5410 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi retirado e colocado em vials para análise.

A validação dos métodos analíticos foi baseada nas normas e recomendações do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) e no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Os critérios adotados foram: Faixa de trabalho e Linearidade, Sensibilidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), Precisão, Robustez, Exatidão e Seletividade.

#### Análise do teor de tilosina em resíduo real

Após validação dos métodos analíticos, procedeu-se para a aplicação desse método na análise de resíduos reais. Para tanto, o resíduo foi coletado em empresa produtora de frangos de corte, localizada em Minas Gerais. A amostragem, via técnica de quarteamento, foi realizada em 2 galpões (boxes) da empresa, contendo, cada um,

cerca de 17 mil aves matrizes (poedeiras), sendo o primeiro galpão (R) na fase de recria (7 a 17 semanas de idade) e o 2º galpão (CG) na fase de produção (18 a 76 semanas de idade). A coleta de cerca de 2 kg de cama de aviário em cada box foi feita durante o período de aplicação do antibiótico tilosina nos frangos.

Até o momento do preparo da amostra, os resíduos foram armazenados em freezer (-16°C). O preparo da amostra foi realizado conforme descrito anteriormente, e a análise feita conforme os métodos analíticos validados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação do Método 1: Quantificação de elevadas concentrações de tilosina em HPLC-UV

Para otimização das condições cromatográficas, diferentes colunas (LiChrospher 100 HP RP-18 – 5 µm, 250 x 4 mm e Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> - 4 µm, 4,6 x 100 mm), fases móveis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M pH 2,5 : ACN (80:20 v/v) e ACN:H<sub>2</sub>O (90:10 v/v)), fluxos (0,5, 1,0 e 1,5 mL.min<sup>-1</sup>), temperaturas do forno (25°C, 30°C e 35°C) e volumes de injeção (5 e 10 µL) foram testados. As condições cromatográficas otimizadas consistiram na utilização da coluna Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> mantida em 35°C, fase móvel acetonitrila-água (90:10) com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> em eluição isocrática, detecção via UV-Vis em 280 nm. Volume de injeção de 10 µL e tempo de corrida de 5 minutos. Sob essas condições, o pico analítico obtido apresentou-se bem definido e livre de cauda, como mostrado na Figura 1. O tempo de retenção (TR) encontrado foi de 1,461 minutos.

Os resultados da faixa de trabalho estão indicados na Figura 2. As seis curvas de calibração foram construídas dentro do intervalo de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> a 100 mg.L<sup>-1</sup> e obtiveram coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) acima de 0,9997, o qual satisfaz o critério mínimo aceitável estabelecido pela FDA (2007) de 0,995. A equação de reta utilizada nos demais procedimentos de validação é a obtida pela curva 5 e foi 'Área = 4657,3[Tyl] + 1335,3'.

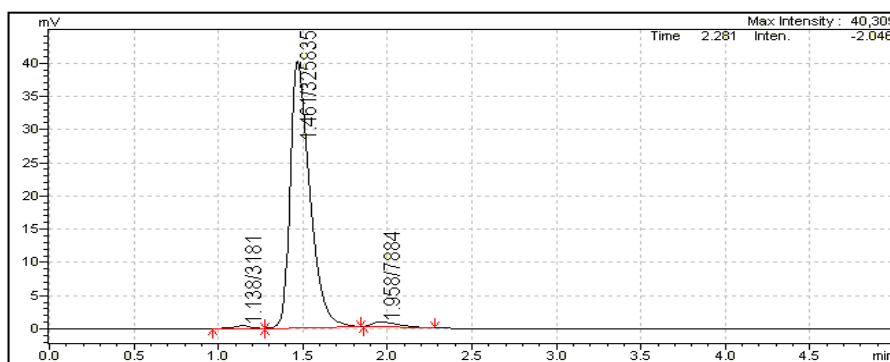


Figura 1: Cromatograma otimizado para detecção e quantificação de tilosina segundo o método 1.

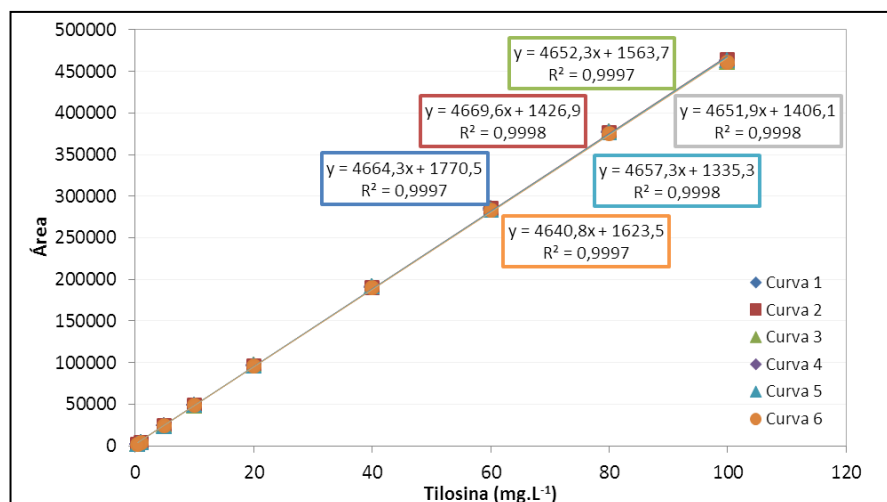


Figura 2: Linearidade e faixa de trabalho para o método 1 de determinação de tilosina

A sensibilidade da metodologia calculada utilizando-se a curva de regressão linear foi de 4628,25. O cálculo do LD e LQ foi realizado com os dados das seis curvas de calibração construídas. O limite de detecção (LD) calculado para o método foi de 0,105 mg.L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação (LQ) foi de 0,349 mg.L<sup>-1</sup>.

A precisão na faixa de trabalho – apresentada na forma de repetitividade – permitiu avaliar o coeficiente de variação dos resultados obtidos para seis réplicas em cada nível. Os resultados foram satisfatórios, ficando compreendidos entre 0,263% e 3,757%, uma vez que não foram encontrados valores superiores a 5%, que é o limite máximo aceitável pela ANVISA (2012) e pelo MAPA (2011). A precisão intermediária do método proposto foi determinada pela análise de seis réplicas da solução padrão de 60 mg.L<sup>-1</sup> por dois analistas (Analista 1 e Analista 2) em dois dias diferentes (Dia 1 e Dia 2). Os resultados também atenderam aos critérios dessas agências, os quais foram de 0,394% (Analista 1, Dia 1), 0,087% (Analista 2, Dia 2) e 1,044% (entre os analistas).

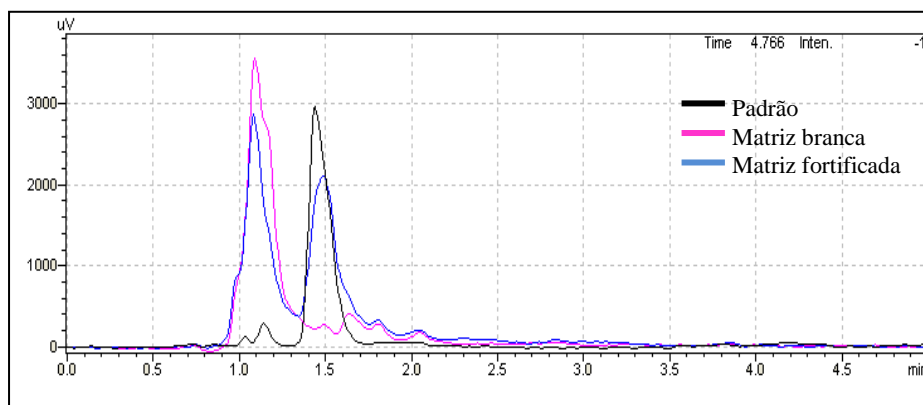
O estudo de robustez do método foi realizado pela variação em dois parâmetros na análise de seis réplicas da solução padrão de 60 mg.L<sup>-1</sup>. O comprimento de onda foi variado em  $\pm 2$  nm (278 e 282 nm) e o fluxo de fase móvel foi variado em  $\pm 0,1$  mL.min<sup>-1</sup> (0,9 e 1,1 mL.min<sup>-1</sup>). Os resultados da variação das áreas e dos tempos de retenção (TR) estão apresentados na Tabela 2. O coeficiente de variação entre todas as alterações e o método original atingiu 6,71%.

**Tabela 2: Robustez do método 1**

Réplicas	Método original		Variação: Comprimento de onda				Variação: Fluxo de fase móvel			
	(280 nm / 1,0 mL.min <sup>-1</sup> )		278 nm		282 nm		0,9 mL.min <sup>-1</sup>		1,1 mL.min <sup>-1</sup>	
	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR
<b>Média</b>	311280	1,545	308144	1,558	318674	1,559	347479	1,697	283076	1,427
<b>SD</b>	438,71	0,006	311,97	0,010	371,43	0,010	501,63	0,003	527,92	0,009
<b>CV (%)</b>	0,141	0,379	0,101	0,669	0,117	0,657	0,144	0,115	0,186	0,676

A exatidão do método foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação do analito na matriz de esterco de aves. Conforme determinações do MAPA (2011), esse estudo foi realizado em cinco níveis (5, 20, 40, 60 e 80 mg.L<sup>-1</sup>) com seis réplicas em cada nível. Para o método 1, as porcentagens de recuperação variaram de 85,94% a 112,91%, o que é considerado satisfatório segundo a FDA (2007), que determina os limites de recuperação do analito entre 80% e 120%, e segundo o MAPA (2011), cujo critério de aceitação da recuperação se compreende entre 80% e 110%.

A seletividade do analito na matriz foi verificada de forma simultânea à determinação da exatidão. Para exemplificar a seletividade, a Figura 3 mostra os picos referentes ao padrão de 5 mg.L<sup>-1</sup> (preto), a matriz branca não-fortificada (rosa) e a matriz fortificada em 5 mg.L<sup>-1</sup> (azul).



**Figura 3: Cromatogramas da solução padrão de 5 mg.L<sup>-1</sup> de tilosina (preto), matriz branca (rosa) e matriz fortificada em 5 mg.L<sup>-1</sup> (azul), via método 1.**

### Validação Método 2: Quantificação de baixas concentrações de tilosina em HPLC-MS

De posse do método 1 (HPLC-UV) otimizado, partiu-se para a otimização das condições cromatográficas em HPLC-MS para a análise de baixas concentrações de tilosina. Para tanto, manteve-se a utilização da mesma coluna cromatográfica (Poroshell 120 EC-C<sub>18</sub> - 4 µm, 4,6 x 100 mm), mesma temperatura do forno (35°C) e mesmo volume de injeção (10 µL). A fase móvel utilizada foi acetonitrila- ácido fórmico (1%) com fluxo de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> em eluição isocrática. Os parâmetros linha de dessolvatação (DL) e heat block (HB) foram mantidos em 250°C e 400°C, respectivamente. O tempo de corrida total foi de 9 minutos. Sob essas condições, o pico analítico obtido apresentou-se bem definido, como mostrado na Figura 4, com razão m/z de 196,40 para o íon precursor e 173,65 para o íon produto. O tempo de retenção (TR) encontrado foi de 5,641 minutos.

Os resultados da faixa de trabalho estão indicados na Figura 5. As seis curvas de calibração foram construídas dentro do intervalo de 5 ng.L<sup>-1</sup> a 100 ng.L<sup>-1</sup> e obtiveram coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) acima de 0,995, o qual corresponde ao critério mínimo aceitável estabelecido pela FDA (2007). A equação de reta utilizada nos demais procedimentos de validação é a obtida pela curva 2, dada por 'y[Área] = 965,47x[Tyl] - 1153,1'.

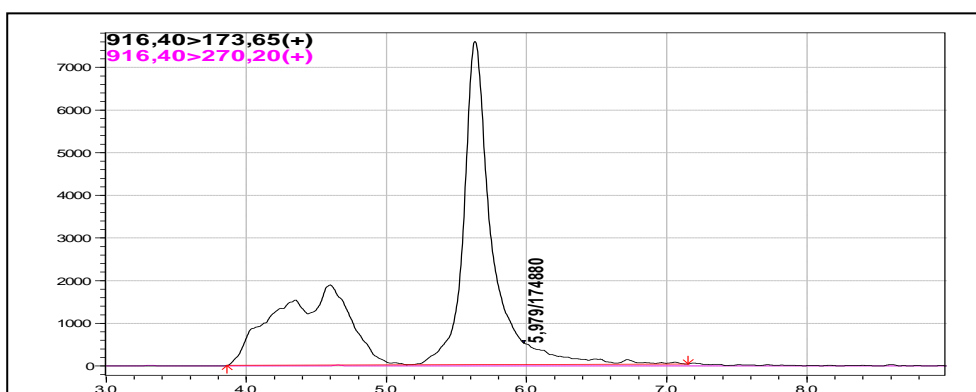


Figura 4: Cromatograma otimizado para detecção e quantificação de tilosina segundo o método 2.

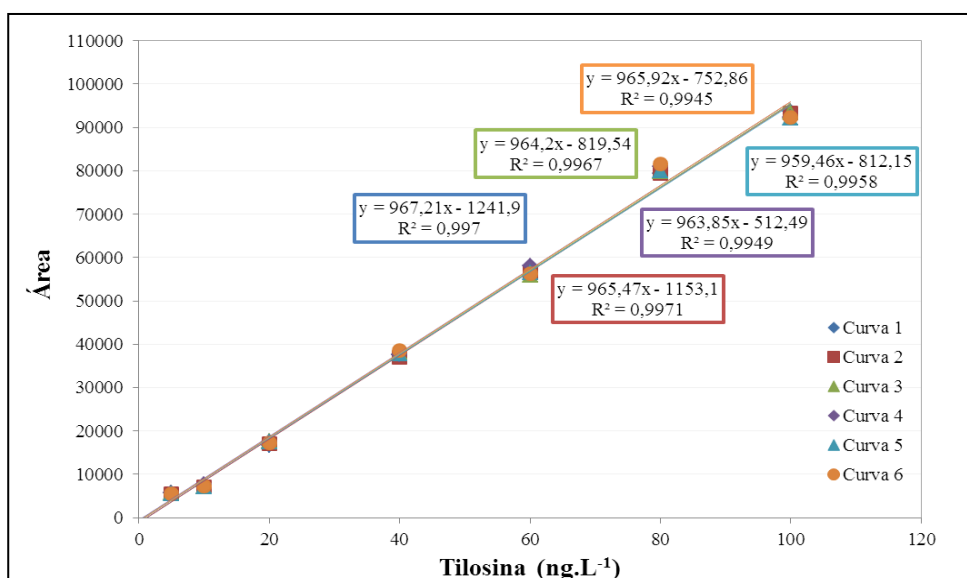


Figura 5: Linearidade e faixa de trabalho para o método 2 de determinação de tilosina



A sensibilidade da metodologia calculada utilizando-se a curva de regressão linear foi de 924,06. O cálculo do LD e LQ foi realizado com os dados das seis curvas de calibração construídas. O limite de detecção (LD) calculado para o método foi de 0,841 mg.L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação (LQ) foi de 2,802 mg.L<sup>-1</sup>.

Da mesma forma que para o método 1, a precisão na faixa de trabalho apresentou resultados satisfatórios, ficando compreendidos entre 0,719% e 3,244%, uma vez que não foram encontrados valores superiores a 5%, que é o limite máximo aceitável pela ANVISA (2012) e pelo MAPA (2011). A precisão intermediária do método proposto foi determinada pela análise de seis réplicas da solução padrão de 60 ng.L<sup>-1</sup> por dois analistas (Analista 1 e Analista 2) em dois dias diferentes (Dia 1 e Dia 2). Os resultados também atenderam aos critérios dessas agências, os quais foram de 1,46% (Analista 1, Dia 1), 2,55% (Analista 2, Dia 2) e 2,61% (entre os analistas).

O estudo de robustez do método foi realizado pela variação em dois parâmetros na análise de seis réplicas da solução padrão de 80 mg.L<sup>-1</sup>. A temperatura da linha de solvatação (DL) foi variada em  $\pm 10^\circ\text{C}$  (240°C e 260°C) e a temperatura do heat block (HB) foi variada também em  $\pm 10^\circ\text{C}$  (390°C e 410°C). Os resultados da variação das áreas e dos tempos de retenção (TR) estão apresentados na Tabela 3. O coeficiente de variação entre todas as alterações e o método original atingiu 7,61%.

**Tabela 3: Robustez do método 2**

Parâmetros	Método original		Variação: Linha de dissolvatação - DL				Variação: Heat Block - HB			
	(DL 250°C / HB 400°C)		240°C		260°C		390°C		410°C	
	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR
<b>Média</b>	105743	5,645	131171,8	5,621	116846	5,621	116078	5,618	124447	5,617
<b>SD</b>	3264,7	0,0067	935,3	0,0069	2771,2	0,0054	2438,9	0,0070	3056,8	0,0063
<b>CV (%)</b>	3,087	0,118	0,713	0,123	2,372	0,0096	2,101	0,125	2,456	0,111

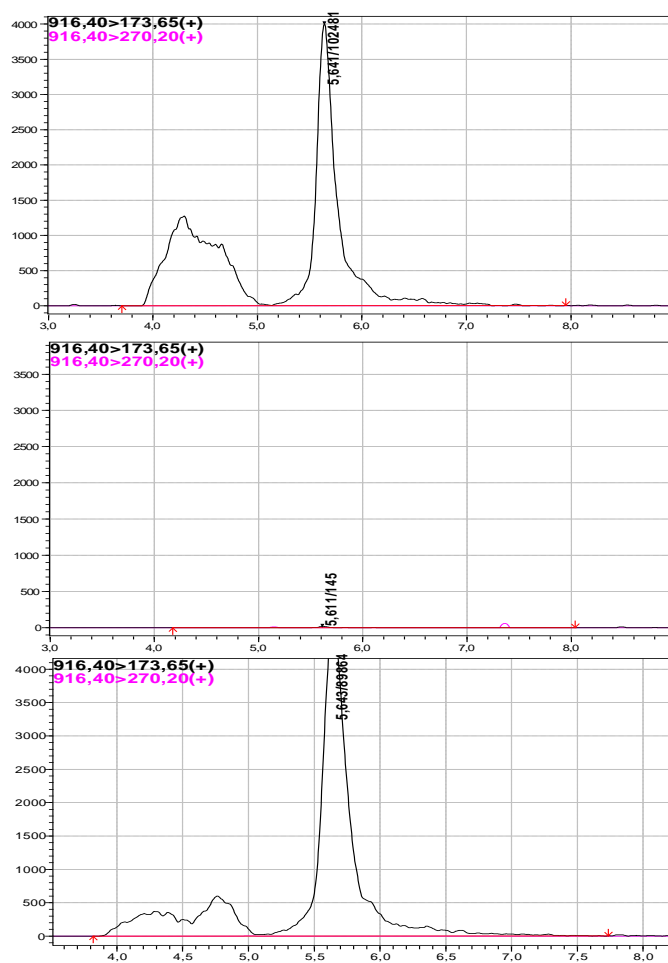
Da mesma forma que para o método 1, a exatidão do método 2 foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação do analito na matriz de esterco de aves. Esse estudo também foi realizado em cinco níveis (5, 20, 40, 80 e 100 ng.L<sup>-1</sup>) com seis réplicas em cada nível. Para esse método, as porcentagens de recuperação variaram de 87,02% a 119,80%, considerado satisfatório segundo a FDA (2007) e MAPA (2011).

A seletividade do analito na matriz foi verificada de forma simultânea à determinação da exatidão. Para exemplificar a seletividade, a Figura 6 mostra os picos referentes ao padrão de 80 ng.L<sup>-1</sup> (a), a matriz branca não-fortificada (b) e a matriz fortificada em 80 ng.L<sup>-1</sup> (c).

### Quantificação de tilosina em resíduo real

Após coleta dos resíduos provenientes de aves matrizes em duas fases, recria – R e produção – CG, procedeu-se para a extração do antibiótico veterinário tilosina nessas amostras, conforme descrito anteriormente. Para tanto, os 2 kg de cama de aviário coletados, em cada galpão, foram adequadamente homogeneizados e amostrados cerca de 10 g. A extração do analito foi realizada em 10 réplicas para cada amostra.

A Tabela 4 apresenta os resultados de quantificação de tilosina nas amostras coletadas. É possível observar que o resíduo proveniente das aves em fase de recria possui um teor de tilosina médio de  $19,18 \pm 1,17 \text{ ng.L}^{-1}$ , que corresponde a  $1,53 \pm 0,09 \text{ g.ton}^{-1}$ . Já para as aves em fase de produção, os resultados mostraram um teor de tilosina de  $32,96 \pm 3,29 \text{ ng.L}^{-1}$ , correspondente a  $2,64 \pm 0,26 \text{ g.ton}^{-1}$ . A discrepância nos resultados pode ser atribuída ao tempo de alimentação com suplementação de tilosina pelo animal, visto que para recria o tempo de contato é em torno de 10 semanas, e para produção em torno de 56 semanas.



**Figura 6: Cromatogramas da (a) solução padrão de 80 ng.L<sup>-1</sup>, (b) matriz branca e (c) matriz fortificada em 80 ng.L<sup>-1</sup>.**



**Tabela 4: Teor de tilosina quantificado nas amostras de cama de aviário provenientes de aves matrizes em fase de recria e de produção.**

Réplicas	Fase de Recria			Fase de Produção		
	Área	Tilosina (ng.L <sup>-1</sup> )	TR (min)	Área	Tilosina (ng.L <sup>-1</sup> )	TR (min)
<b>1</b>	18143	19,99	5,435	29948	32,21	5,557
<b>2</b>	16275	18,05	5,442	31374	33,69	5,402
<b>3</b>	18476	20,33	5,466	25237	27,33	5,399
<b>4</b>	15604	17,36	5,433	34979	37,42	5,533
<b>5</b>	17509	19,33	5,428	31239	33,55	5,396
<b>6</b>	18359	20,21	5,430	28278	30,48	5,406
<b>7</b>	15625	17,38	5,429	29855	32,12	5,550
<b>8</b>	18402	20,25	5,428	32136	34,48	5,398
<b>9</b>	17910	19,74	5,423	27944	30,14	5,388
<b>10</b>	17371	19,19	5,145	22781	38,17	5,391
<b>Média (n=10)</b>	17367,4	19,18	5,406	29377,1	32,96	5,442
<b>SD (n=10)</b>	1132,2	1,17	0,092	3510,5	3,29	0,073
<b>CV (%)</b>	6,52	6,11	1,71	11,95	9,97	1,33

## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A metodologia proposta de extração e quantificação do composto ativo tilosina em amostras de cama de aviário foi validada para altas e baixas concentrações segundo instruções normativas da ANVISA e do MAPA.

Os dois métodos desenvolvidos apresentaram linearidade satisfatória ( $R^2 \geq 0,995$ ), alta precisão (Método 1:  $0,227\% \geq CV \geq 3,757\%$  e Método 2:  $0,719\%$  e  $3,244\%$ ) e precisão intermediária elevada ( $CV < 5\%$ ). O estudo de robustez para os métodos apresentou coeficientes de variação abaixo de 10% para todas as alterações (Método 1:  $6,71\%$  e Método 2:  $7,61\%$ ).

A metodologia de extração desenvolvida apresentou alta recuperação do analito, ficando compreendida entre 85,94% a 112,91% para o método 1 e 87,02% a 119,80% para o método 2. Ao verificar a seletividade do analito frente a matriz branca, observou-se pelos cromatogramas que não há sobreposição de picos no tempo de retenção determinado para o analito para cada um dos métodos.

Por fim, a análise do resíduo avícola proveniente de grande empresa produtora de frangos de corte no estado de Minas Gerais, mostrou teor de  $19,18 \pm 1,17$  ng.L<sup>-1</sup> tilosina ( $1,53 \pm 0,09$  g.ton<sup>-1</sup>) em cama de aviário de galpão contendo aves na fase de recria e  $32,96 \pm 3,29$  ng.L<sup>-1</sup> tilosina ( $2,64 \pm 0,26$  g.ton<sup>-1</sup>) em cama de aviário de galpão contendo aves na fase de produção.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (código de financiamento nº001) e ao suporte financeiro das seguintes agências/instituições: Fundação Nacional da Saúde – FUNASA, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico – CNPq, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/>.
2. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RDC nº 27 de 17 de maio de 2012.
3. ANGENT, L. T., MAU, M., GEORGE, U., ZAHN, J. A., & RASKIN, L. Effect of the presence of the antimicrobial tylosin in swine waste on anaerobic treatment. *Water Research*. v. 42, p. 2377–2384, 2008.
4. BOXALL, A. Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicology Letters*, 142, n. 3, p. 207–218, 2003.
5. HORIE, M., SAITO, K., ISHII, R., YOSHIDA, T., HARAMAKI, Y., & NAKAZAWA, H. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 812, p. 295–302, 1998.
6. KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2008.
7. LEAL, R. M. P., FIGUEIRA, R. F., TORNISIELO, V. L., & REGITANO, J. B. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 432, p. 344–349, 2012.
8. LOKE, M., INGERSLEV, F., HALLING-SØRENSEN, B., & TJØRNELUND, J. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography, *Chemosphere*, v. 40, p. 759–765, 2000.
9. MAM - Ministério da Agricultura e do Mar. Resumo das características do medicamento. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. - Governo de Portugal, 2014.
10. MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA/ACS, 2011.
11. MARTÍNEZ-CARBALLO, E., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., SCHARF, S., & GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, v. 148, n. 2, p. 570–579, 2007.
12. OK, Y. S., KIM, S.-C., KIM, K.-R., LEE, S. S., MOON, D. H., LIM, K. J., YANG, J. E. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 174, n. 1–4, p. 693–701, 2011.
13. PALERMO-NETO, J., ALMEIDA, R. T., SPINOZA, H., GÓRNIK, S., & BERNARDI, M. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 641–658, 2006.
14. PINHEIRO, A., ROSA ALBANO, R. M., ALVES, T. C., KAUFMANN, V., & DA SILVA, M. R. Veterinary antibiotics and hormones in water from application of pig slurry to soil. *Agricultural Water Management*, v. 129, p. 1–8, 2013.
15. PRADO, N., OCHOA, J., & AMRANE, A. Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 11, p. 1302–1306, 2009.
16. SARMAH, A. K., MEYER, M. T., & BOXALL, A. B. 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, 2006.
17. SISMOTTO, M., AUGUSTO, J., & PASCHOAL, R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 449–461, 2013.
18. SPISSO, B. F., FERREIRA, R. G., PEREIRA, M. U., MONTEIRO, M. A., CRUZ, T. Á., PINTO, R., WANDERLEY, A. 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, 2010.
19. STONE, J. J., CLAY, S. A., & SPELLMAN, G. M. Tylosin and chlortetracycline effects during swine manure digestion : Influence of sodium azide. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 9515–9520, 2010.
20. TEETER, J. S., & MEYERHOFF, R. D. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research*, v. 93, p. 45–51, 2003.
21. THOMPSON, T. S., NOOT, D. K., CALVERT, J., & PERNAL, S. F. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1020, p. 241–250, 2003.
22. ZHAO, L., DONG, Y. H., & WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 5, p. 1069–1075, 2010.