UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ROSANA GOMES FERREIRA

Estudo de Viabilidade da Produção de Material de Referência do Anticoccidiano Ionóforo Poliéter Salinomicina em Matriz Ovo

Rio de Janeiro

2014

Rosana Gomes Ferreira

Estudo de Viabilidade da Produção de Material de Referência do Anticoccidiano Ionóforo Poliéter Salinomicina em Matriz Ovo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadoras: Verônica Maria de Araújo Calado
Bernardete Ferraz Spisso

Rio de Janeiro
2014

Ferreira, Rosana.
Estudo de Viabilidade da Produção de Material de Referência do Anticoccidiano Ionóforo Poliéter Salinomicina em Matriz Ovo / Rosana Gomes Ferreira. – 2014.
f. : 112. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Verônica Maria de Araújo Calado e Bernardete Ferraz Spisso

1. material de referência. 2. ovo. 3. salinomicina. I. Calado, Verônica e Spisso, Bernardete. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título.

Rosana Gomes Ferreira

Estudo de Viabilidade da Produção de Material de Referência do Anticoccidiano Ionóforo Poliéter Salinomicina em Matriz Ovo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em ____/ ____/ _____

_____

(Verônica Maria de Araújo Calado, Drª, EQ/UFRJ)

_____

(Bernardete Ferraz Spisso, Drª, INCQS/Fiocruz)

_____

(Marcus Henrique Campino de la Cruz, Dr, INCQS/Fiocruz)

_____

(Lourdes Maria Pêssoa Masson, Drª, IFRJ)

_____

(Eliana Flávia Camporese Sérvulo, Drª, UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela força e pela fé que não deixam desanimar nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido, Marcio, por todo apoio, incentivo, cuidado, compreensão e paciência durante o período que me dediquei a este trabalho.

Aos meus pais, Luiz e Elisa, e minha irmã, Rosângela, por todo amor, apoio e incentivo de todos os dias, pelas orações e torcidas pelas minhas conquistas.

Às minhas orientadoras, Drª Verônica Calado e Drª Bernardete Spisso, por acreditarem em mim, pelo estímulo, pela motivação e, principalmente, pela orientação.

Ao Dr. Filipe Q. Soares, chefe do Departamento de Química do INCQS/Fiocruz, pela confiança e oportunidade de realizar o curso de mestrado.

A toda a equipe do Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários do INCQS/Fiocruz, Jair, Júlia, Leandro, Mararlene, Mychelle e Rafaela, amigos e companheiros, pelos conhecimentos compartilhados, por todo auxílio e colaboração durante a realização desse trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Microbiologia em Alimentos do INCQS/Fiocruz, Carla e Marcelo pelo treinamento do uso do liofilizador e por permitirem o uso do mesmo, imprescindível à execução deste trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais e Educacionais – LabDAFEE do INJC/UFRJ, Drª Anna Paola Pierucci, Ana Carolina e André Mesquita, pela oportunidade de uso do mini *spray dryer* e por toda a ajuda nas etapas envolvendo o uso deste equipamento, também imprescindíveis à execução deste trabalho.

Às amigas Adherlene, Betânia, Juliana, Patrícia e Tatiana, pela amizade, pelo carinho, apoio e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e torceram pela sua concretização, meus sinceros agradecimentos.

“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência.”

Chico Xavier

RESUMO

FERREIRA, Rosana Gomes. **Estudo de Viabilidade da Produção de Material de Referência do Anticoccidiano Ionóforo Poliéter Salinomicina em Matriz Ovo.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Um estudo de viabilidade da produção de um material de referência permite avaliar qual é a melhor forma de preparo, tratamento e processamento da matriz, além de estabelecer os melhores métodos de análise e técnicas estatísticas a serem empregados na avaliação dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização do material. Materiais de referência representam ferramentas para o controle de qualidade de laboratórios acreditados ou que almejam a acreditação pela ISO/IEC 17025. Há uma escassez de materiais de referência na área de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal, o que dificulta o controle e a vigilância desses resíduos nos alimentos. Orientações sobre a preparação dos materiais de referência estão disponíveis na ISO Guia 35. No Brasil, é autorizado o uso de anticoccidianos ionóforos poliéteres exclusivamente em rações para auxiliar na prevenção da coccidiose em frangos de corte e frangas de reposição. A presença de resíduos dessas substâncias em ovos ocorre através da contaminação (não intencional) em rações destinadas a poedeiras comerciais. A proposta de se produzir um material de referência de salinomicina, um anticoccidiano ionóforo poliéter, tendo o ovo como matriz, é importante para que os laboratórios possam expandir seu escopo analítico e melhorar significativamente a confiabilidade das análises, contribuindo assim para o controle e vigilância destes resíduos em ovos. O objetivo principal deste trabalho foi estudar a viabilidade da produção de um material de referência de salinomicina na matriz ovo. Como técnicas de preservação da matriz foram utilizadas a liofilização e a desidratação por *spray drying.* Os estudos de homogeneidade e estabilidade dos lotes produzidos foram avaliados conforme as recomendações da norma ISO Guia 35. Outras técnicas estatísticas, além das descritas na norma, foram utilizadas nestes estudos. Os resultados mostraram que tanto a liofilização quanto a secagem por *spray drying* são adequadas para desidratar a matriz e assegurar a estabilidade do material. Porém, algumas vantagens e desvantagens para os diferentes processamentos foram observadas. Algumas técnicas estatísticas utilizadas nos estudos de homogeneidade e estabilidade se mostraram mais adequadas do que as técnicas propostas pela norma ISO Guia 35. Os estudos de homogeneidade e estabilidade dos lotes, realizado de acordo com as técnicas estatísticas propostas pela ISO Guia 35, demonstraram que todos os lotes se apresentaram homogêneos e, que para a preservação da integridade da matriz, o material deve ser transportado livre de calor, sendo mantido na faixa de temperatura de 25 ºC a -20 ºC. Fundamentando-se pelas informações de estabilidade do analito encontradas na literatura, e do ovo em pó industrializado, espera-se que o material seja estável nas condições de tempo e temperatura estabelecidas no planejamento do estudo de estabilidade de longa duração. Portanto, os resultados obtidos até o momento, subsidiam a viabilidade da produção do material de referência de salinomicina em matriz ovo, que poderá se tornar um material de referência candidato à certificação.

Palavras-chaves: material de referência, ovo, salinomicina.

ABSTRACT

FERREIRA, Rosana Gomes. **Estudo de Viabilidade da Produção de Material de Referência do Anticoccidiano Ionóforo Poliéter Salinomicina em Matriz Ovo.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A feasibility study on the production of a reference material allows the evaluation of the best way of matrix preparing, handling and processing, besides establishing the more suitable analytical methods and statistical techniques to be used in the evaluation of material homogeneity, stability studies and characterization. Reference materials represent valuable tools for the quality control of accredited laboratories or those that aims accreditation by ISO/IEC 17025. There is a shortage of reference materials in the field of veterinary drug residues in food of animal origin, which hampers the control and surveillance of these residues in food. Guidance on the preparation of reference materials is available in ISO Guide 35. In Brazil, the use of anticoccidial polyether ionophores is allowed in feeds exclusively to assist in the prevention of coccidiosis in broilers and replacement pullets. The presence of residues of these substances in eggs occurs through contamination (unintentional) in feed for laying hens. The proposal to produce a reference material of salinomycin, an ionophore anticoccidial polyether in egg matrix is important for laboratories to expand their analytical scope and significantly improve the reliability of the analysis, thus contributing to the control and monitoring of these residues in eggs. The main objective of this work was to study the feasibility of producing a reference material of salinomycin in egg matrix. Preservation techniques used were lyophilization and spray drying dehydration. The studies of homogeneity and stability of the produced batches were evaluated according to the recommendations of ISO Guide 35 standard. Other statistical techniques beyond those described in the standard were used in these studies. The results showed that both the freeze-drying as spray drying are suitable for dehydrating the matrix and ensuring the stability of the material. However, some advantages and disadvantages for different processes were observed. Some statistical techniques used in the studies of homogeneity and stability studies were more appropriate than those proposed by ISO Guide 35 standard. The homogeneity and stability studies of lots held in accordance with the proposed ISO Guide 35 statistical techniques showed that all batches were homogeneous and in order to preserve the integrity of the matrix, the material must be transported free of heating being maintained in the temperature range of 25 ºC to -20 ºC. Based on information from regarding, the stability of the analyte described in the literature, and the stability of industrialized egg power, it is expected that the material be stable under the time and temperature conditions established in the design of the long term stability study. So, the results obtained up to now supports the feasibility of production of salinomycin reference materials in egg matrix, which may become a reference material candidate for accreditation.

Keywords: reference material, eggs, salinomycin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura molecular da salinomicina 19

Figura 2 Amostras de 2, 4, 5 e 6 g de ovo liofilizado..... 46

Figura 3 Amostras liofilizadas reconstituídas após descanso de 24h a 4 ºC..... 47

Figura 4 Pedaços das amostras liofilizadas (A) e amostras liofilizadas e trituradas (B)..... 47

Figura 5 Amostras liofilizadas e trituradas reconstituídas após 24h sobre refrigeração de 4 ºC..... 48

Figura 6 Espectro de massas da salinomicina (*m/z* 773) no modo de aquisição varredura total..... 49

Figura 7 Espectro de massas da salinomicina (*m/z* 773)..... 49

Figura 8 Principais fragmentações do íon precursor da salinomicina $[M+Na]^+$ (*m/z* 773)..... 50

Figura 9 Cromatogramas de íon extraído da amostra original (A) e da amostra fortificada com salinomicina (B), apresentando a transição de quantificação *m/z* 773.5/431.1..... 51

Figura 10 Gráficos dos valores de umidade dentro dos frascos dos materiais de referência produzidos em função da ordem de pesagem dos frascos..... 55

Figura 11 Gráficos de tendência dos resultados na ordem exata de medição para o estudo de homogeneidade dos lotes 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E)..... 58

Figura 12 Gráficos de tendência dos resultados das médias das injeções das amostras (frascos) em função do número sequencial relacionado ao processo de produção dos lotes 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E)..... 59

Figura 13 Gráficos de controle de médias e amplitudes das concentrações de salinomicina para avaliação de tendências devido a desvios nas medições de cada lote..... 60

Figura 14 Gráficos de controle de médias e amplitudes das médias das concentrações de salinomicina para avaliação de tendências devido à preparação dos lotes..... 61

Figura 15 Gráficos de repetitividade e reprodutibilidade (A) e Box-Plot (B) das concentrações de salinomicina para os lotes 1 e 2..... 64

Figura 16 Gráfico de comparação da concentração média de salinomicina entre os lotes 1 e 2 em relação a cada amostra..... 66

Figura 17 Média e intervalo de confiança dos resultados de concentração de 5 µg/kg de salinomicina nas amostras para o lote 1..... 68
Figura 18 Gráfico de tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade dos MR-SAL, produzidos por liofilização, lotes 1 e 2, a 50 ºC durante 14 dias..... 69
Figura 19 Gráficos de tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade dos MR-SAL a 25 ºC durante 30 dias..... 70
Figura 20 Gráficos de tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade dos MR-SAL a -20 ºC durante 30 dias..... 71
Figura 21 Alteração da coloração da amostra com o tempo de armazenamento a 50 ºC em comparação com as amostras armazenadas a -20 ºC para o lote 1..... 72
Figura 22 Gráficos das variações da concentração de salinomicina em função do tempo, nas temperaturas de 25 ºC e -20 ºC, para os lotes 3 (temperatura de secagem = 150 ºC), 4 (temperatura de secagem = 120 ºC) e 5 (temperatura de secagem = 180 ºC) produzidos pela desidratação por *spray drying*..... 73
Figura 23 Gráfico ilustrando a variação do N° de TBA em função do tempo para as diferentes temperaturas testadas das amostras do lote 1 para 50°C e lote 2 para 25 °C e -20°C 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições de Operação do Processo de Desidratação por Mini *Spray Dryer*..... 38

Tabela 2 Condições dos Estudos de Estabilidade e Curta Duração dos Lotes Produzidos..... 43

Tabela 3 Resultados das Análises de Umidade e Sólidos Totais na Amostra Fortificada..... 51

Tabela 4 Eficiência e Rendimento dos Processos de Liofilização dos Lotes 1 e 2.... 52

Tabela 5 Rendimento dos Processos de *Spray Drying* dos Lotes 3, 4 e 5..... 54

Tabela 6 Resultado das Análises de Umidade e Sólidos Totais para os Lotes Produzidos..... 55

Tabela 7 Valor-P das Análises de Variância para Regressão Linear das Medições e dos Lotes Produzidos..... 62

Tabela 8 Análises de Variância de Fator Único do Estudo de Homogeneidade dos Lotes Produzidos..... 62

Tabela 9 Incertezas das Homogeneidades (U_{bb}) para os Lotes Produzidos..... 63

Tabela 10 Análise de R&R para as Amostras Liofilizadas..... 64

Tabela 11 Tabela de ANOVA para as Amostras Liofilizadas..... 65

Tabela 12 Teste *F* para Duas Amostras para Variâncias..... 66

Tabela 13 Médias de Injeções para Cada Replicata de Extração das Concentrações de Salinomicina Encontradas nas Amostras..... 67

Tabela 14 Análise de Variância com Fator Único da Concentração de Salinomicina nas Amostras Fortificadas a um Nível de 5µg/kg e Processadas por Liofilização e *Spray Drying*..... 68

Tabela 15 Dados Obtidos da Análise de Regressão e Avaliação da Inclinação do Estudo de Estabilidade de Curta Duração a 50 ºC para o MR-SAL Produzido por Liofilização..... 69

Tabela 16 Dados Obtidos da Análise de Regressão e Avaliação da Inclinação do Estudo de Estabilidade de Curta Duração a 25 ºC para os Lotes de MR-SAL Produzidos..... 70

Tabela 17 Dados Obtidos da Análise de Regressão e Avaliação de Inclinação do Estudo de Estabilidade de Curta Duração a -20 ºC para os Lotes de MR-SAL Produzidos..... 71

Tabela 18 Valor-P das Análises de Variância de Fator Único para o Estudo de Estabilidade de Cada Lote..... 74

Tabela 19 Resultados das Análises de Oxidação Lipídica das Amostras de MR-SAL Liofilizadas Utilizadas no Estudo de Estabilidade de Curta Duração..... 74

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
CID	*Collision Induced D*issociation, Dissociação induzida de colisão
COMAR	*Code d'Indexation des Matériaux de Référence*, Código de Indexação de Materiais de Referência
EDTA	Ácido etileno dianimo tetra acético
EPTIS	*European Proficiency Testing Information System,* Sistema de informação de ensaios de proficiência da Europa
ESI	*Electrospray Ionization*, Ionização por eletrospray
FOA	Ácido fórmico
HPLC	*High Performance Liquide Chromatography*, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HTST	*High Temperature-Short Time,* Temperatura alta – tempo curto
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRMM	*Institute for Reference Materials and Measurements,* Instituto de Materiais de Referência e Medição da União Europeia
IP	Ionóforos poliéteres
IV	Infravermelho
LAS	Lasalocida
LIC	Limite inferior de controle
LC/MS	*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry,* Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*, Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
LSC	Limite superior de controle
LSD	*Least Significant Difference,* Diferença Mínima Significativa
LTLT	*Low Temperature- Long Time,* Temperatura baixa – tempo longo
MAD	Maduramicina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCQ	Material de controle de qualidade
MeOH	Metanol
MON	Monensina
MR	Materiais de Referência
MRC	Materiais de Referência Certificadods

MRM	*Multiple Reaction Monitoring*, Monitoramento de Reações Múltiplas
MR-SAL	Material de referência de salinomicina
MS	*Mass Spectrometer,* Espectrômetro de Massas
MS/MS	*Tandem Mass Spectrometer,* Espectrometria de massas sequencial
NaOAc	Acetato de sódio
NAR	Narasina
NIG	Nigericina
NIST	*National Institute for Standards and Technology*, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
PNCRC/Animal	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAL	Salinomicina
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SEN	Senduramicina
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SPE	*Solid phase extraction,* Extração por fase sólida
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
UBABEF	União Brasileira de Avicultura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 15
1.1. O Ovo – a Matriz..... 15
1.1.1. Características do Ovo..... 15
1.2.2. Alterações das Propriedades do Ovo Durante o Armazenamento e o Processo de Deterioração..... 16
1.2. Os Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres..... 16
1.2.1. Ocorrências de Resíduos de Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres em Ovos..... 18
1.2.2. A Salinomicina – o Analito..... 19
1.2.3. Análise de Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres em Ovos..... 21
1.3. Métodos de Conservação da Matriz..... 22
1.3.1. Pasteurização..... 23
1.3.2. Desidratação..... 24
1.3.2.1. Liofilização..... 25
1.3.2.2. Secagem por Atomização (*Spray drying*)..... 25
1.33. Conservação dos Alimentos Desidratados e Efeito dos Tratamentos Térmicos no Ovo..... 26
1.4. Os Materiais de Referência..... 28
1.4.1. Estudo de Viabilidade da Produção de Materiais de Referência..... 28
1.5. Estudo de Homogeneidade..... 29
1.6. Estudo de Estabilidade..... 30
1.7. Métodos de Caracterização..... 31
1.7.1. Caracterização do Padrão por Espectrometria de Massas (MS)..... 31
1.7.2. Caracterização do Material de Referência..... 32
1.8. Justificativa da Proposta..... 33
2. OBJETIVO..... 35
2.1. Objetivos Específicos..... 35
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 36
3.1. Materiais..... 36
3.2. Métodos..... 36
3.2.1. Teste para Determinação da Quantidade de Ovo a Ser Liofilizada por Frasco..... 36
3.2.2. Caracterização do Padrão de Salinomicina por MS..... 37

3.2.3. Preparação do Candidato à Material de Referência..... 37
3.2.3.1. Fortificação da Amostra..... 37
3.2.3.2. Liofilização da Amostra Fortificada por Liofilização e Envase 37
3.2.3.3. Desidratação da Amostra Fortificada no Mini *Spray Dryer* e seu Envase... 38
3.2.4. Verificação de Vácuo..... 39
3.2.5. Determinação da Umidade Residual e de Sólidos Totais 39
3.2.6. Método de Análise para a Determinação da Concentração de Salinomicina..... 39
3.2.7. Estudo de Homogeneidade dos Lotes..... 40
3.2.8. Avaliação da Equivalência entre os Lotes dos Materiais Liofilizados..... 42
3.2.9. Avaliação de Alterações Significativas no Nível de Salinomicina no Ovo pelos Processos de Desidratação por *Spray Drying* e Liofilização..... 42
3.2.10. Estudo de Estabilidade de Curta Duração..... 42
3.2.11. Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica pela Determinação Direta do Valor de Ácido Tiobarbitúrico..... 44
3.2.12. Planejamento do Estudo de Estabilidade de Longa Duração..... 44
3.2.13. Caracterização do Candidato a Material de Referência..... 45
4. RESULTADOS..... 46
4.1. Avaliação do Teste de Determinação da Quantidade do Ovo a Ser Liofilizado por Frasco..... 46
4.2. Caracterização do padrão por MS..... 48
4.3. Avaliação da Amostra Fortificada..... 50
4.3.1. Quanto à Concentração de Salinomicina..... 50
4.3.2. Quanto ao Teor de Umidade e Sólidos Totais..... 51
4.4. Avaliação dos Lotes Produzidos por Liofilização..... 52
4.5. Avaliação dos Lotes Produzidos por Desidratação por *Spray Drying*..... 53
4.6. Determinação da Umidade Residual e de Sólidos Totais dos Lotes Produzidos..... 54
4.7. Estudo de Homogeneidade..... 56
4.8. Avaliação da Equivalência entre os Lotes Produzidos por Liofilização..... 63
4.9. Avaliação de Alterações Significativas no Nível de Salinomicina no Ovo pelos Processos de Liofilização e Desidratação por Atomização (*Spray Drying)*..... 66
4.10. Estudo de Estabilidade de Curta Duração..... 68
4.11. Avaliação da Oxidação Lipídica das Amostras de MR-SAL Liofilizadas Utilizadas no Estudo de Estabilidade de Curta Duração..... 74

4.12. Planejamento do Estudo de Estabilidade de Longa Duração..... 75
4.13. Caracterização do Candidato à Material de Referência..... 76
4.14. Considerações Finais 76
5. CONCLUSÃO..... 78
6. PERSPECTIVAS FUTURAS..... 79
7. REFERÊNCIAS..... 80

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Ovo – a Matriz

O ovo é um alimento de origem animal bastante consumido pela população brasileira, uma vez que o conteúdo líquido completo é uma excelente fonte de nutrientes. De acordo com o último Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura (UBABEF) de 2013, o consumo per capita de ovos ao ano de 2012 foi em média de 161,53 unidades/ habitante. A produção de ovos comerciais no Brasil está bastante concentrada na região Sudeste do país e foi de aproximadamente 31 bilhões de unidades em 2012, sendo que 99% dessa produção destinou-se ao mercado interno e apenas 1% da produção foi destinada à exportação. As exportações brasileiras de ovos somaram 26,8 mil toneladas em 2012, o que representa um aumento de 61,2% em relação a 2011, sendo 94,47% de produtos in natura e 5,53% de produtos processados (UBABEF, 2013).

O ovo também é considerado uma matéria-prima básica na indústria de alimentos, devido às suas propriedades funcionais, tais como a emulsificação, a formação de espuma e a gelificação. Essas propriedades naturais do ovo inteiro são aplicáveis em produtos de panificação, misturas de padaria, maionese e molho para salada, doces, sorvetes, massas e outros alimentos. Os produtores de alimentos que usam ovo como matéria-prima tendem a usar ovos em pó, ovos líquidos pasteurizados, ou ovos congelados em vez de ovos inteiros. O transporte e armazenamento de ovos em pó é menos oneroso e requer menos espaço. Com baixo teor de umidade, o ovo em pó é menos suscetível ao crescimento microbiano e a fácil uniformidade da dosagem do ovo em pó o torna um ingrediente ideal para a indústria alimentícia (KOÇ; GÜNGOR; ERTEKIN, 2012).

1.1.1. Características do Ovo

Segundo Ordóñez (2005a), a clara do ovo é basicamente uma solução aquosa de proteínas de natureza viscosa; a variabilidade do conteúdo em proteína (9,7 a 10,6%) é atribuída à idade da ave. O conteúdo lipídico (0,03%) é muito baixo, comparando-se ao da gema. O percentual de carboidratos é de 0,8% e o de minerais é de 0,5%, sendo o potássio e o sódio os mais abundantes.

A gema do ovo é uma emulsão de gordura em água com extrato seco em torno de 50%, formada por um terço de proteínas e dois terços de lipídeos. A fração lipídica é constituída por 66% de triglicerídeos, 28% de fosfolipídeos e 5% de colesterol. O conteúdo de carboidratos é similar ao da clara. A gema é mais rica em vitaminas do que a clara, e contém principalmente vitamina A e ácido pantotênico. Sua coloração é devida

principalmente à presença de carotenóides. Entre os minerais, predominam o fósforo, o potássio e o cálcio (ORDÓÑEZ, 2005a; BOBBIO; BOBBIO, 1992).

1.1.2. Alterações das Propriedades do Ovo Durante o Armazenamento e o Processo de Deterioração

De acordo com Ordóñez (2005a), durante o armazenamento dos ovos, a clara sofre aumento de pH de valores de 7,6 a 9,2 em apenas três dias de armazenamento a 3ºC, devido à perda de dióxido de carbono através dos poros da casca. Esse aumento de pH provoca ruptura da estrutura de gel característica da camada densa da clara, e com isso, há perda da consistência ou viscosidade da clara. Na gema, as mudanças de pH oscilam entre valores de 6 e 6,5. Durante o envelhecimento do ovo, ocorrem alterações nas membranas, favorecendo também a deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Quanto mais baixa for a temperatura de armazenamento e quanto menores forem as perdas de água e de CO_2, menores serão as perdas de qualidade (ORDÓÑEZ, 2005a). As propriedades funcionais da clara de ovo não sofrem mudanças significativas quando submetidas ao processo de congelamento/descongelamento desde que se realize congelamento rápido para evitar a presença de cristais grandes que possam permanecer retidos na clara do ovo durante o descongelamento. Quando as gemas são congeladas separadamente, é observado um aumento da viscosidade e decréscimo da solubilidade do produto descongelado, sobretudo se ele foi mantido abaixo de - 6°C (ORDÓÑEZ, 2005b).

No ovo inteiro, o aumento da viscosidade também é observado, embora esse fenômeno seja menos acentuado do que nas gemas, talvez pelo efeito diluente da clara. Esse aumento da viscosidade deve-se, igualmente, às interações entre os componentes do ovo que provocam a formação do gel. A maioria das propriedades funcionais do ovo não se modifica com o congelamento (ORDÓÑEZ, 2005b).

1.2. Os Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres

Uma grande variedade de medicamentos anticoccidianos, também chamados de coccidiostáticos, é utilizada na indústria de frangos para prevenir a coccidiose. A coccidiose é uma doença de grande importância veterinária, que atinge tanto animais mamíferos quanto aves, causada por protozoários do gênero *Eimeria*. Os principais sintomas dessa doença nas aves são: diarreia, desidratação, penas arrepiadas, anemia e despigmentação da pele, dentre outros sinais clínicos. A coccidiose aviária em nosso país representa um dos

maiores problemas para tratamento e controle, acarretando sérios prejuízos econômicos (FERREIRA et al, 2014; NETTO, 1989).

De acordo com a natureza química e a principal atividade biológica, os anticoccidianos podem ser divididos em dois grupos: os ionóforos poliéteres - IP (lasalocida - LAS, maduramicina - MAD, monensina - MON, narasina - NAR, salinomicina - SAL e senduramicina - SEN) e os compostos não ionóforos, envolvendo substâncias estruturalmente diferentes (decoquinato, diclazuril, halofuginona, nicarbazina e robenidina) (DORNE et al, 2013).

Os antibióticos ionóforos poliéteres são usados como anticoccidianos e como aditivos em alimentos para animais, com o propósito de estimular o desenvolvimento e ganho de peso. Os IP não são usados na medicina humana. Estudos em animais e casos de exposição acidental em seres humanos têm mostrado que os IP provocam efeitos cardiovasculares, insuficiência renal e outros sintomas (SPISSO et al, 2010a, DORNE et al, 2013, NOGUEIRA; FRANÇA; VARGAS, 2009).

Há uma grande variação na susceptibilidade dos efeitos tóxicos dos ionóforos de acordo com a espécie animal. Cada anticoccidiano ionóforo tem sua toxicidade. A intoxicação pode ocorrer quando dosagens elevadas de ionóforos são adicionadas aos alimentos, ou são incluídos inadvertidamente ou acidentalmente em dosagens não corretas para determinada espécie animal. Quando usados nas espécies-alvo, dentro das dosagens recomendadas pelo fabricante, são considerados seguros. Casos de intoxicação têm sido descritos em bovinos, ovinos, suínos, equinos, cães, gatos e aves. As aves são as principais espécies alvos para o uso de anticoccidianos. Os sinais de intoxicação causados por esses compostos em espécies de aves incluem distúrbios locomotores, dispneia grave e diarreia moderada (DORNE et al, 2013, NOGUEIRA; FRANÇA; VARGAS, 2009).

Um caso de intoxicação humana causada por inalação acidental de SAL resultou em uma internação de seis semanas do indivíduo, com os sintomas de lesão e dor muscular, fraqueza, sudorese e taquicardia (STORY; DOUBE, 2004).

Com relação aos riscos para a saúde humana, relacionados ao consumo de alimentos contendo esses resíduos, cada coccidiostático tem um perfil toxicológico individual. Como a maioria dos coccidiostáticos licenciados nunca foi autorizada para utilização em animais que não sejam o alvo, o banco de dados disponíveis para a avaliação de efeitos adversos para a saúde é muito limitado, confinado principalmente a relatos de intoxicações de animais de fazenda e alguns estudos de tolerância, não tem muitas vezes uma descrição completa da concepção experimental e da taxa de exposição. No que diz respeito ao risco relacionado à saúde humana, os níveis máximos de resíduos em tecidos foram estabelecidos para as espécies-alvo e têm de ser derivados a partir dos dados disponíveis para outros produtos alimentares, tais como o leite e os ovos, que não são

incluídos na avaliação durante o processo de autorização de coccidiostáticos para espécies-alvo (DORNE et al, 2013).

Desde 2009, é estabelecido pela União Européia, o Limite Máximo de Tolerância de 3 μg/Kg para SAL em ovo (Commission of European Communities, 2009).

1.2.1. Ocorrências de Resíduos de Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres em Ovos

No Brasil, é indicado o uso de anticoccidianos ionóforos poliéteres exclusivamente em rações para auxiliar na prevenção da coccidiose em frangos de corte e frangas de reposição (BRASIL, 2008). As galinhas poedeiras são as espécies não alvo mais suscetíveis à exposição de anticoccidianos em condições práticas, pois os restos de ração medicada para criação de frangos de corte podem permanecer nos silos de alimentação e subsequentemente contaminar rações para aves poedeiras. Em princípio, a aplicação de anticoccidianos para galinhas poedeiras não é essencial, a partir do ponto de vista clínico, uma vez que pela idade destes animais, geralmente já adquiriram imunidade (DORNE et al, 2013).

A presença de resíduos dessas substâncias em ovos ocorre então por meio da contaminação (não intencional) em rações destinadas a poedeiras comerciais. A principal fonte de contaminação localiza-se na fábrica de rações, devido à presença de resíduos de anticoccidianos nos misturadores (MAZZUCO, 2006).

A comprovação da qualidade analítica na área de alimentos é fundamental para a saúde pública e para a exportação desses produtos, além de ser cada vez mais exigida pelos consumidores. Objetivando promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), que é operacionalizado por meio de quatro subprogramas, dentre eles o subprograma de monitoramento, que visa verificar a frequência, níveis e distribuição dos resíduos e contaminantes em produtos de origem animal. Este subprograma baseia-se em análises laboratoriais de amostras coletadas aleatoriamente em estabelecimentos registrados sob a égide do Serviço de Inspeção Federal – SIF (MAPA, 2014).

O PNCRC/Animal, instituído pela Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) Nº 42 de 20 de dezembro de 1999, é composto pelos seus programas setoriais para o monitoramento em carnes e demais produtos de origem animal, dentre eles, o PNCRC/Ovos. Para o ano de 2013, foi publicada a Instrução Normativa SDA N.º 17, de 29 de maio de 2013, que aprovou o escopo analítico para o monitoramento dos produtos de

origem animal nesse ano incluindo os analitos lasalocida, maduramicina, monensina, salinomicina e senduramicina, do grupo dos anticoccidianos, no subprograma de monitoramento de controle de resíduos e contaminantes em ovos. O nível do Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória para estes analitos em ovo estabelecido foi de 10 µg/Kg (MAPA, 2014).

Foram publicados os resultados das análises de ovos realizadas pelo PNCRC/Animal em 2011 e 2012, através da Instrução Normativa Nº 7, de 4/04/2012 e Instrução Normativa Nº 07, de 27/03/2013, respectivamente, mostrando que 100% das amostras analisadas nesses dois anos, 31 em 2011 e 60 em 2012 para LAS e 43 para os demais analitos[1] em 2012, estavam conformes (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013).

Em 2010, um estudo sobre a ocorrência de resíduos de antibióticos em ovos de diferentes marcas, coletados no município do Rio de Janeiro, apresentou a análise de anticoccidianos IP em 100 amostras empregando uma metodologia baseada na extração com solvente e determinação pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Foram encontrados resíduos de MAD, MON, NAR, SAL e SEN em, respectivamente, 1%, 3%, 5%, 21% e 4% do total de amostras analisadas, com 2% de amostras não conformes para SAL de acordo com os valores preconizados pela União Européia (SPISSO et al, 2010b).

1.2.2. A Salinomicina – o analito

A salinomicina, sal de sódio de poliéter do ácido monocarboxílico, é um fármaco do grupo dos antibióticos ionóforos, produzida pela fermentação por bactérias do gênero *Streptomyces*. Esse fármaco é empregado como anticoccidiano na avicultura, e como promotor de crescimento em bovinos e ovinos. A Figura 1 mostra a estrutura molecular da salinomicina (ALBERTON et al, 2011).

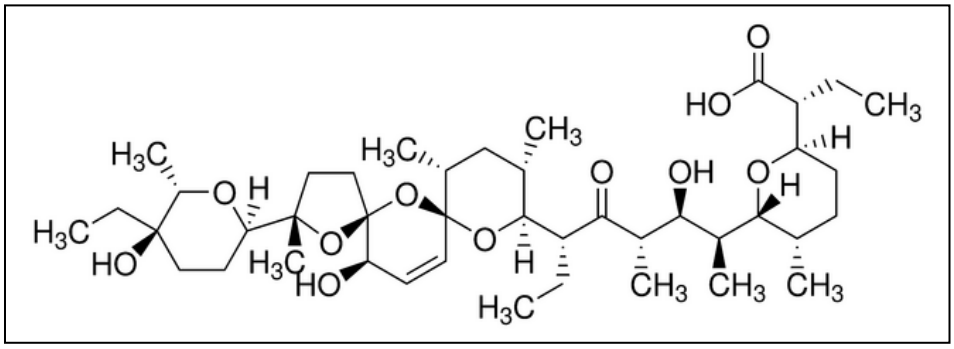


Figura 1. Estrutura molecular da salinomicina.

[1] Analitos: monensina, clopidol, senduramicina, trimetoprim, salinomicina, diaveridina, toltrazuril, robenidina, amprolio, narasina, diclazuril e maduramicina.

A salinomicina de sódio é autorizada na União Europeia nos termos do Regulamento nº (CE) 1831/2003 como um anticoccidiano para utilização em frangos de engorda com um teor máximo do ingrediente ativo na alimentação de 70 mg/kg e intervalo de segurança de um dia, para frangas de postura (até 12 semanas de idade) com um teor máximo de 50 mg/kg e sem período de carência (EFSA, 2008).

No Brasil, a salinomicina tem seu uso autorizado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como aditivo anticoccidiano na alimentação animal de frangos de corte, frangas de reposição e codornas para auxiliar na prevenção da coccidiose, tendo como restrições de uso a não administração a galinhas poedeiras e frangos acima de 16 semanas de idade, além de não ser permitido o acesso a perus adultos e equinos a rações contendo salinomicina, pois a ingestão pode ser fatal (BRASIL, 2008).

Sinais de intoxicação, incluindo efeitos cardiovasculares (aumento da pressão sanguínea e de degeneração miocárdica), anorexia, fraqueza, ataxia e paralisia foram relatados em várias espécies de animais não-alvo. Estes sinais se relacionam com o modo de ação dos ionóforos e ocorrem também nas espécies-alvo em doses que excedam o nível máximo autorizado. Estudos cinéticos em várias espécies de animais mostraram que a salinomicina é rapidamente absorvida, metabolizada e eliminada completamente do organismo em poucos dias (EFSA, 2008).

Um estudo de monitoramento da presença de salinomicina em ovos e tecidos de galinhas poedeiras alimentadas com rações contendo salinomicina (60 mg/kg), realizado por Sinigoj- Gacnik e Zorman Rojs (2008), evidenciou o acúmulo de salinomicina nos ovos. Para a gema, os níveis de salinomicina começaram a ser detectados a partir do segundo dia de exposição a SAL na alimentação, sendo que a concentração aumentou lentamente e atingiu o valor máximo (849 μg/kg) no terceiro dia após a retirada. Depois a concentração diminuiu lentamente até que não foi detectada a presença de SAL em algumas gemas no oitavo dia após a retirada. No entanto, algumas gemas ainda continham pequenas quantidades de SAL até o décimo dia após a retirada. Em contraste, as concentrações de SAL na clara foram extremamente baixas (5 – 20 μg/kg), e a presença de SAL foi detectada apenas nos dias em que as aves receberam a alimentação que continha o analito e dois dias após a retirada. Foi observada também uma grande variação na concentração de SAL nas gemas entre ovos postos por diferentes animais no mesmo dia. Isso pode ser explicado pela fisiologia da produção de ovos. Medicar galinhas poedeiras leva ao acúmulo de drogas em gemas de ovos presentes no oviduto durante a fase de crescimento folicular rápido, e assim, concentrações elevadas de medicamentos ainda podem ser esperadas em ovos após 7 a 11 dias de retirada.

Uma relação linear entre a concentração de SAL na ração e nos ovos pôde ser estabelecida por Kennedy, Hughes e Blanchflower (1998), por exemplo: a concentração nos ovos (µg/kg de produto) é igual a 3,33 vezes a concentração na ração (mg/kg).

1.2.3. Análise de Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres em Ovos

A determinação de resíduos de medicamentos veterinários envolve uma etapa de extração dos compostos de interesse e limpeza do extrato, seguida da análise cromatográfica, geralmente acoplada à espectrometria de massas (PRESTES et al, 2013).

Uma pesquisa bibliográfica sobre as metodologias analíticas utilizadas para determinação de anticoccidianos ionóforos poliéteres em ovos, publicadas a partir do ano 2000, demonstrou que das 15 publicações estudadas, 8 utilizaram a técnica de extração por fase sólida (SPE) e outras utilizaram extração simples e direta com solvente, sendo que a maioria dos métodos empregou acetonitrila (ACN) como solvente de extração. Com relação à técnica para identificação e quantificação dos analitos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC–MS/MS) com ionização por eletrospray (*electrospray ionization*, ESI) e monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi a mais utilizada. A técnica de LC–MS/MS possui a vantagem de ser mais específica e seletiva, além de permitir a execução de ensaios de multi-resíduos (FERREIRA et al, 2013).

As técnicas de extração líquido-líquido e extração sólido-líquido continuam sendo amplamente empregadas, devido à simplicidade de execução e a acetonitrila é considerada um dos melhores solventes, pois promove uma extração bastante eficiente com altos percentuais de recuperação e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz, sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas (PRESTES et al, 2013).

A cromatografia é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizam-se instrumentos que podem ser totalmente automatizados e empregam colunas recheadas com materiais de partículas menores (fase estacionária), sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. O detector é o componente que mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solução que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. Esse sinal é gerado assim que o efluente sai da coluna e chega ao detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como

sobre a estrutura do analito. O espectrômetro de massas (MS) é um instrumento sofisticado constituído de três partes: fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas e detector de íons de aquisição/ processamento de dados. Diferenças nesses três componentes distinguem os tipos de técnicas de espectrometria de massas empregadas em HPLC. Em todas elas, após a injeção de amostras no MS, ocorre a produção de íons pela fonte de ionização, uma vez que o MS só detecta espécies carregadas. Uma vez formados os íons, eles são analisados pelo analisador de massas de acordo com a sua relação massa/carga (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Entre os analisadores de massas normalmente empregados na determinação de resíduos de medicamentos veterinários, o triplo quadrupolo é o mais amplamente utilizado. Com a introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização por eletrospray, foi permitido o emprego da técnica de LC-MS/MS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários de elevado peso molecular e termossensíveis (PRESTES et al, 2013).

O acoplamento da cromatografia líquida com espectrometria de massas apresenta várias vantagens, como ser universal e de alta seletividade, o qual permite a quantificação de picos sobrepostos; ter boa detectibilidade; avaliar a pureza do pico; confirmar a presença do analito mediante a informação de massa molecular e estrutural, sendo essa a característica mais relevante (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

1.3. Métodos de Conservação da Matriz

Todos os alimentos podem sofrer deterioração entre a colheita, o processamento e a estocagem antes do consumo. A deterioração pode ocorrer devido a fatores físicos, químicos, enzimáticos e microbiológicos. A maioria dos métodos de conservação é elaborada para inibir o crescimento de microrganismos. A *Samonella* é o principal patôgeno comumente associado com ovos e produtos de ovos. Embora outros microrganismos tenham sido isolados de ovos, eles não têm sido frequentemente citados em surtos de doenças transmitidas por alimentos. Em ovos, a deterioração ocorre principalmente devido a microrganismos como *Pseudomonas* spp., *Proteus vulgaris, Alteromonas* spp. e *Serrarita marcescens,* além da *Salmonella*. Esses microrganismos produzem uma variedade de putrefações (DOWNES; ITO, 2001, FORSYTHE, 2002).

Segundo Rosenthal (2008), os métodos de preservação baseiam-se justamente na combinação adequada de certas condições que contribuirão para aumentar o tempo de estocagem do alimento, facilitando assim a sua comercialização, manuseio e transporte.

Na indústria de alimentos, a secagem é um dos processos utilizados para a conservação dos mesmos. A escolha do método de secagem de um alimento depende das suas características, aspectos que se têm o interesse de preservar, tempo de vida útil pretendido, pré-existência de maquinário na indústria, viabilidade econômica, entre outros fatores (ORDÓÑEZ, 2005b; GARCIA, 2009).

O ovo sem casca pode ser preservado por pasteurização, atomização ou ainda por liofilização, embora essa técnica seja menos utilizada por seu elevado custo. Os dois primeiros processos envolvem aquecimento do produto (BOBBIO; BOBBIO, 1992; ORDÓÑEZ, 2005a).

De acordo com Ordóñez (2005b), para produtos desidratados, a redução do número de microrganismos como resultado das operações de desidratação é baixa e a inativação de enzimas é apenas parcial. O efeito de dessorção da água na sobrevivência dos microrganismos e na atividade enzimática é variável. Comprovou-se que alguns organismos e certas enzimas são mais termorresistentes no meio desidratado do que no meio úmido. Por essas razões, em geral, realiza-se previamente um tratamento térmico (branqueamento, pasteurização ou esterilização). Durante a desidratação, também podem ocorrer outras alterações (sobretudo se a temperatura for relativamente elevada), entre as quais se podem mencionar o escurecimento não enzimático e mudança de cor, ocasionados pela reação de Maillard e oxidação lipídica.

O congelamento de produtos derivados do ovo é um dos processos mais utilizados hoje para sua conservação. Pode-se congelar o ovo inteiro sem casca, a gema ou a clara separadamente. A maioria das propriedades funcionais do ovo não se modifica com o congelamento; mas um ligeiro decréscimo da capacidade espumante ocorre devido à insolubilização ou desnaturação das proteínas (ORDÓÑEZ, 2005a). O congelamento e armazenamento a -18°C não destroem totalmente os microrganismos presentes nos alimentos, embora esses sofram algum dano pelo choque térmico, pelo crescimento de cristais de gelo intracelulares e pelo aumento de concentração dos solutos na fração não congelada (ORDÓÑEZ, 2005b).

1.3.1. Pasteurização

A pasteurização tem como objetivo principal destruir os microrganismos patogênicos não esporulados associados ao alimento em questão. Seu objetivo secundário é aumentar a vida de prateleira do alimento, reduzindo as taxas de alterações microbiológicas e enzimáticas, de modo a oferecer ao consumidor um produto seguro, com vida útil aceitável, para ser consumido em pouco tempo (AZEREDO, 2012; ORDÓÑEZ, 2005b).

Em função dos parâmetros cinéticos de resistência térmica de um determinado microrganismo mais resistente, geralmente patogênico, e da sensibilidade ao calor dos parâmetros de qualidade do produto e das características do alimento, estabelece-se o processo de pasteurização, que pode ser lenta ou rápida. A pasteurização lenta, em inglês, *Low Temperature Long Time* (LTLT), consiste na utilização de temperaturas baixas (60 ºC a 75 ºC) e tempos altos (10 a 30 minutos). Já a pasteurização rápida, em inglês, *High Temperature Short Time* (HTST), utiliza temperaturas altas (80 ºC a 95 ºC) e tempos baixos (5 s a 30 s) (ROSENTHAL, 2008).

Um dos parâmetros mais relevantes no estabelecimento da vida de prateleira de um alimento é a temperatura. Este fator é importante tanto na etapa de processamento como na estocagem do produto (ROSENTHAL, 2008). A temperatura máxima que pode ser aplicada ao ovo é limitada pela coagulação da clara; por isso os tratamentos mais rígidos são empregados em ovos inteiros e em gemas, e os mais suaves, em claras. As combinações tempo/temperatura necessárias para a destruição dos microrganismos, fundamentalmente *Salmonella*, são ou se aproximam muito das que afetam negativamente as propriedades físicas e funcionais desses produtos. As temperaturas recomendadas oscilam entre 64 a 65ºC durante 2 a 20 minutos, porém, o mais comum é empregar tempos inferiores a 8 minutos (ORDÓÑEZ, 2005a).

Produtos pasteurizados podem conter ainda muitos organismos vivos capazes de crescer, o que limita sua vida de prateleira. Assim, muitas vezes, a pasteurização é combinada com outros métodos de conservação, que pode ser a refrigeração, a adição de conservadores, a embalagem do produto em condições anaeróbicas e até mesmo a fermentação com microrganismos selecionados. A vida de prateleira do alimento pasteurizado é determinada em função do tratamento térmico realizado, do processo complementar de conservação e das condições de estocagem (AZEREDO, 2012; ROSENTHAL, 2008).

1.3.2. Desidratação

A desidratação é um tratamento que confere aos produtos derivados do ovo uma série de vantagens sobre os que foram tratados por outros procedimentos:

- Podem ser armazenados em temperatura ambiente, sem o risco de desenvolvimento microbiano, devido à baixa atividade de água do produto.
- Custo de armazenamento e transporte menores que os dos produtos derivados do ovo líquido, congelado ou concentrado.
- São produtos homogêneos e fáceis de utilizar.

- Permitem realizar um controle preciso da quantidade de água adicionada nas formulações dos produtos aos quais são incorporados, como também sua utilização em forma seca.

A desidratação pode ser feita pelo método de cilindros, mas, para evitar a perda de funcionalidade das proteínas, é muito mais recomendável a atomização do produto. É possível aplicar também o processo de liofilização, embora essa técnica seja menos utilizada por seu custo elevado (ORDÓÑEZ, 2005b).

1.3.2.1. Liofilização

Liofilização ou criosecagem (*freeze-drying*) é um processo de desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura tais que a água, previamente congelada, passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso (sublimação). Como este processo é realizado à temperatura baixa e na ausência de ar atmosférico, as propriedades químicas e organolépticas praticamente não são alteradas (GAVA, 1981).

A liofilização é uma técnica adequada para alimentos muito termossensíveis, já que minimiza as alterações de qualidade associadas a altas temperaturas. Graças à ausência de água líquida e às baixas temperaturas utilizadas no processo, a maioria das alterações inerentes à secagem por ar aquecido são minimizadas. Além disso, as alterações de odor, sabor e cor são mínimas, assim como as alterações nutricionais. Por outro lado, a liofilização é conhecida como o processo mais caro de desidratação (AZEREDO, 2012).

O processo de liofilização se mostra eficiente comparado com outros meios de desidratação, frente a características como concentração do produto, perda de voláteis, decomposição térmica, ações enzimáticas e desnaturação de proteínas, por isso merece destaque (GARCIA, 2009).

1.3.2.2. Secagem por Atomização (Spray Drying)

A secagem por atomização, pulverização ou *spray drying* é um processo contínuo onde um líquido ou pasta é transformado em produto seco, caracterizando-se pelo tempo de secagem relativamente curto (GAVA, 1981).

A secagem por atomização envolve a pulverização de um alimento líquido, formando gotículas que são lançadas numa câmara fechada, entrando em contato com uma corrente de ar aquecido em fluxo concorrente/contracorrente, o qual supre o calor necessário à evaporação, havendo, assim, formação de partículas secas. O pó produzido é então descarregado, continuamente, da câmara de secagem. O tempo de permanência do produto

no secador é curto (de 5 s a 100 s), o que é de importância vital para os alimentos termossensíveis. O tamanho das partículas é de 10 µm a 500 µm, muito pequeno, se comparado a outros processos de secagem. Embora o equipamento seja caro, o custo de manutenção do sistema é baixo (AZEREDO, 2012).

Os secadores por atomização têm inúmeras aplicações na indústria de alimentos, como por exemplo: cereais e extratos de plantas, lácteos em geral, cafés, leveduras, hidrolisados de proteínas, derivados marinhos, subprodutos de frigoríficos, ovos, sopas em pó, frutas e extratos de frutas (ROSA; TSUKADA; FREITAS, 2013).

A eficácia do *spray dryer* está baseada no princípio do aumento de área de contato entre o material a ser seco e o agente dessecante, ou seja, o ar quente. Esta característica de gerar na atomização uma alta área superficial por grama do líquido é inigualável no *spray-dryer* (ROSA; TSUKADA; FREITAS, 2013).

Devido à possível presença de *Salmonella* no ovo, deve-se incluir a prévia pasteurização do ovo líquido antes da secagem por atomização. Para produção de ovo desidratado em pequena escala, pode-se adquirir o ovo integral pasteurizado resfriado que, atualmente, é vendido por encomenda em quantidades mínimas de embalagens de 1 kg.

É necessário que se conheça muito bem as características e composição da amostra a ser desidratada por *spray drying* para evitar alterações na composição, propriedades e funcionalidade do produto, e também evitar o entupimento do atomizador por sólidos presentes na amostra a ser pulverizada, assim como a formação de aglomerados e de géis devido à alta temperatura do ar e se obter um bom rendimento do produto. Na maioria das vezes, é necessário fazer uma diluição na amostra para que esta possa atingir uma condição melhor para o processamento no *spray drying*.

1.3.3. Conservação dos Alimentos Desidratados e Efeito dos Tratamentos Térmicos no Ovo

A umidade final do produto desidratado costuma situar-se entre 1 e 5%, o que permite sua conservação durante períodos de tempo relativamente longos (até um ano). Contudo, durante seu armazenamento, podem surgir diversas alterações, que normalmente podem ser evitadas com embalagem adequada e correta manipulação (ORDÓÑEZ, 2005b).

A pasteurização em pouco, ou nada, afeta a gema enquanto a clara pode ter diminuída sua capacidade de formar espumas estáveis, dando uma espuma de menor volume. A presença de glucose na clara leva à ocorrência do escurecimento não enzimático pelo aquecimento.

As alterações provocadas pela secagem são pouco evidentes quando o produto é estocado por pouco tempo. Após algumas semanas, entretanto, as alterações são consideráveis tanto na gema quanto na clara, cujas propriedades estruturais ficam alteradas devido às transformações provenientes da reação de Maillard (BOBBIO; BOBBIO, 1992). A reação de Maillard é a principal causa do escurecimento desenvolvido nos alimentos durante o aquecimento e armazenamento prolongado. A reação envolve aldeído e grupos amina de aminoácidos, peptídios e proteínas em seu estágio inicial, seguida de várias etapas e culminando com a formação do pigmento escuro. Lipídeos também participam da reação de Maillard, na presença de grupos redutores, como por exemplo, grupos carbonila, que são formados durante a oxidação de lipídeos insaturados. No processo oxidativo de ácidos graxos, compostos carbonílicos como aldeídos, peróxidos e epóxidos são formados e interagem com grupos amina dos aminoácidos e das proteínas. A reação de Maillard ocorre tanto à temperatura elevada como reduzida, durante o processamento do alimento ou armazenamento. A elevação da temperatura provoca o aumento rápido da velocidade de escurecimento. A temperatura afeta a composição do pigmento formado, aumentando o teor de carbono, bem como a intensidade do pigmento (ARAÚJO, 2006).

Os alimentos porosos são muito sensíveis às reações de oxidação (de lipídeos, pigmentos, vitaminas e substâncias aromáticas), o que limita sua conservação. Por isso, aconselha-se o acondicionamento à vácuo ou em atmosferas inertes (N_2), bem como a utilização de materiais impermeáveis ao oxigênio e opacos. Além disso, os alimentos desidratados são frágeis e quebradiços (em particular os que se obtêm por liofilização), devendo, por isso, serem protegidos dos danos mecânicos (ORDÓÑEZ, 2005b).

Embora as baixas temperaturas reduzam bastante a velocidade das reações químicas e enzimáticas, é preciso levar em conta que, nos alimentos congelados a - 18 °C, nem toda a água está congelada (ainda que a atividade de água, a_w, seja baixa), as enzimas não se inativam completamente, e os solutos presentes nessa fase aquosa não-congelada estão muito concentrados, o que, por sua vez, pode modificar as características do meio (pH, força iônica, potencial redox, etc.). Como consequência de tudo isso, algumas reações químicas e enzimáticas podem avançar, mesmo que de forma muito lenta, durante o armazenamento em congelamento. Além disso, os cristais de gelo, depois de formados, não são estáveis e podem experimentar certas mudanças. As mudanças físicas (recristalização e sublimação) e químicas são as principais causas da perda de qualidade dos alimentos durante seu armazenamento em congelamento (ORDÓÑEZ, 2005b).

A preservação do ovo por congelamento produz pequenas alterações na viscosidade da clara, mas alterações irreversíveis ocorrem na gema que sofre uma gelificação das suas lipoproteínas, o que resulta em um produto final com menor capacidade emulsionante. A

clara de ovo liofilizada ao ser reconstituída volta a ter praticamente as mesmas propriedades reológicas do produto fresco (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

1.4. Os Materiais de Referência

Materiais de Referência (MR) e, em particular, Materiais de Referência Certificados (MRC) representam ferramentas valiosas para validação de métodos e verificação de desempenho, além de serem importantes para o controle de qualidade de laboratórios que almejam a acreditação pela ISO/IEC 17025:2005 (ABNT, 2006). MR são materiais cujos valores de propriedades são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição, ou para atribuir valores aos materiais. Os MRC devem, por definição, ser rastreáveis à realização exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos. Cada valor de propriedade deve ser acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido (INMETRO, 2010).

O desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos adequados são elementos importantes para garantir análises confiáveis de resíduos de medicamentos veterinários. Um estudo recente envolvendo laboratórios de análises de medicamentos veterinários revelou o interesse destes na disponibilidade de MR para vários compostos e matrizes. Tal interesse é devido à necessidade de assegurar a confiabilidade dos procedimentos analíticos, desde o manuseio da amostra até a interpretação dos resultados (ZELENY et al, 2006).

1.4.1. Estudo de Viabilidade da Produção de Materiais de Referência

Orientações sobre a preparação dos materiais de referência estão disponíveis nas ISO Guias 31, 34 e 35. Convém que MR sejam certificados com relação à homogeneidade, estabilidade e ao(s) valor(es) de propriedade. Para controle de qualidade interno, entretanto, o último requisito pode ser relevado, mas homogeneidade e estabilidade adequadas são essenciais (INMETRO, 2010).

De acordo com a norma ISO Guia 35, um estudo de viabilidade para se produzir e caracterizar um MR suficientemente homogêneo e estável pode ser considerado para estabelecer questões relacionadas à melhor maneira de se preparar a amostra, à estabilidade do material ou a adequação ao uso. Algumas vezes, um estudo de viabilidade é organizado para permitir aos laboratórios (que, provavelmente, serão) envolvidos na

caracterização que efetuem ajustes de seus equipamentos e seus procedimentos (ABNT, 2012).

Considerando que o MRC a ser desenvolvido consiste em um novo material no mercado, a realização de um estudo de viabilidade é imprescindível e conveniente para demonstrar qual a melhor forma de preparo, tratamento e processamento da matriz para a produção do MRC, visando à preservação das propriedades e composição da matriz durante o tempo requerido de estabilidade do candidato a MRC. As etapas necessárias à preparação do MR podem incluir secagem, redução do tamanho de partículas, peneiramento, estabilização, subdivisão e/ou envase. Outra etapa do estudo de viabilidade é a seleção dos métodos de análise e técnicas estatísticas que serão empregados na avaliação dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização do material.

1.5. Estudo de Homogeneidade

A preparação do MR deve ser realizada de uma maneira que assegure a minimização de heterogeneidade e de instabilidade do material (LINSINGER et al, 2001).

Segundo a ISO Guia 35, é necessário um estudo de homogeneidade em projetos de certificação de lote para demonstrar que o lote de frascos (unidades) é suficientemente homogêneo. Os aspectos de garantia da qualidade são tão importantes quanto a determinação da variação remanescente entre frascos do lote, que é um componente de incerteza a ser incluído na estimativa da incerteza do valor de propriedade do MRC. Ao se lidar com materiais de referência no estado sólido recomenda-se prever um estudo de homogeneidade dentro do frasco para determinar a massa mínima de amostra. O número de amostras adicionais necessárias depende, principalmente, do estudo de homogeneidade entre frascos. O número mínimo de frascos selecionados ao acaso situa-se entre 10 e 30, porém, geralmente, recomenda-se não ser menor que 10 (ABNT, 2012).

Também de acordo com a ISO Guia 35, o número ideal de amostras para um estudo de homogeneidade pode ser determinado através de técnicas de planejamento apoiadas estatisticamente. Além do mais, o número de frascos depende do tamanho do lote, de modo que o número de amostras tiradas do lote pode ser considerado “representativo” do lote todo. Recomenda-se contrabalançar este requisito com a incerteza das medições, que é (em condições de repetitividade) uma função do desvio-padrão de repetitividade da medição e do número de replicatas (ABNT, 2012).

1.6. Estudo de Estabilidade

É essencial planejar e conduzir estudos de estabilidade para avaliar a possível instabilidade e atribuir uma vida útil ao material. O ensaio de estabilidade visa determinar o grau de instabilidade remanescente do candidato a MR após a preparação ou confirmar a estabilidade do material. Uma avaliação do estudo de estabilidade é baseada na diferença entre os resultados das medições efetuadas em amostras armazenadas em diferentes tempos, a uma temperatura fixa. Mesmo materiais “estáveis” podem apresentar instabilidade para um ou mais valores de propriedade. Há dois tipos de estabilidade (ou instabilidade) a serem considerados na certificação de materiais de referência: a estabilidade a longo prazo do material (tempo de prateleira) e a estabilidade a curto prazo (estabilidade do material sob “condições de transporte”) (ABNT, 2012; LINSINGER, 2004).

A estabilidade a longo prazo de um material de referência está associada ao comportamento do MR nas prateleiras do produtor. A estabilidade a curto prazo está associada a quaisquer efeitos extras devidos ao transporte das amostras (ABNT, 2012; LINSINGER, 2004).

Segundo o ISO Guia 35, o estudo de estabilidade a curto prazo é tipicamente realizado em diferentes temperaturas a fim de estudar o efeito da temperatura sobre as propriedades do material. As temperaturas das amostras podem variar durante o transporte de -50ºC a +70ºC, dependendo do tipo de embalagem e modalidade de transporte. Com base nos efeitos observados, podem ser definidas as condições de transporte e elaboradas as instruções de embalagem, para efetivamente eliminar quaisquer efeitos secundários indesejáveis. Um estudo de estabilidade a curto prazo leva, tipicamente, 1 a 2 meses, todavia, pode levar mais tempo quando as condições ideais de armazenamento têm que ser simultaneamente determinadas (ABNT, 2012).

Para um modelo bem sucedido de qualquer estudo de estabilidade, é essencial a existência de condições sob as quais o material é definitivamente estável ou em que se pode, pelo menos, assumir que a instabilidade é insignificante (a razão para não armazenar o material nestas condições pode ser financeira, porque as condições de armazenamento são cautelosas). Por questões práticas, as amostras são frequentemente mantidas primeiramente às temperaturas de investigação e depois transferidas para as condições de referência (LINSINGER, 2004).

Um segundo fator importante é a aleatoriedade das medições. Medições não aleatórias podem levar a conclusões totalmente incorretas relativas à estabilidade do material, tal como uma alteração aparente nos valores observados, que pode dever-se a deriva dos resultados de medição em vez de instabilidade do material. Portanto, a seleção

das amostras e a ordem de medições devem ser distribuídas aleatoriamente para fornecer uma visão geral sobre a estabilidade ao longo de todo o lote (LINSINGER, 2004).

A heterogeneidade entre as unidades pode aumentar a variação do valor de propriedade medida durante um estudo de estabilidade, o que leva a uma avaliação mais pobre da estabilidade (LINSINGER, 2004).

O estudo de estabilidade requer um número considerável de frascos (unidades). De preferência, é conveniente que mais de um frasco esteja disponível para cada ponto no tempo. Há dois modelos experimentais básicos para estudos de estabilidade:

- ✓ o estudo clássico de estabilidade, e
- ✓ o estudo isócrono de estabilidade.

No estudo clássico de estabilidade, amostras individuais preparadas ao mesmo tempo, sob condições idênticas, são avaliadas à medida que o tempo transcorre. O modelo isócrono, proposto por Lamberty; Shimmel e Pauwels (1998), envolve a definição das condições em que o material é considerado como estável. O estado de degradação da amostra pode ser paralisado, armazenando-a sob estas condições. Em seguida, é possível medir todas as amostras de um estudo de estabilidade em condições de repetitividade, em contraste com o estudo de estabilidade clássica, na qual as medições só podem ser realizadas dentro das condições de reprodutibilidade no laboratório, o que leva a uma incerteza relativamente elevada, pois a instabilidade do sistema de medição também está incluída (ABNT, 2012; LINSINGER, 2004).

A abordagem isócrona reduz a dispersão dos pontos ao longo do tempo, aprimorando, assim, a “resolução” do estudo de estabilidade. Como consequência disso, o estudo de estabilidade isócrono, usualmente, leva a uma incerteza menor do que o estudo clássico, dependendo da diferença entre a repetitividade e a reprodutibilidade das medições. Uma desvantagem do modelo isócrono é que os dados de um estudo de estabilidade só se tornarão disponíveis no final do estudo, o que pode, eventualmente, causar atraso na certificação do MR (ABNT, 2012; LINSINGER, 2004; LAMBERTY; SHIMMEL; PAUWELS, 1998).

1.7. Métodos de Caracterização

1.7.1. Caracterização do Padrão por Espectrometria de Massas (MS)

De acordo com Skoog, Holler e Nieman (2002), a espectrometria de massas, dentre todas as ferramentas analíticas disponíveis, é talvez a de mais ampla aplicabilidade, no sentido da técnica ser capaz de fornecer informações sobre a (s):

1) composição elementar de amostras;
2) estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas;
3) composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; e
4) razões isotópicas de átomos nas amostras.

O espectro de massas de uma substância pura fornece vários tipos de dados que são úteis para a sua identificação, como a massa molecular do composto e sua fórmula molecular. A fórmula molecular pode ser determinada a partir do espectro de massas de um composto, uma vez que o pico molecular possa ser identificado e sua massa exata, determinada. Para essa aplicação deve-se utilizar um instrumento de alta resolução, capaz de detectar diferenças de alguns milésimos de unidades de massa (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A técnica de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) consiste na aquisição e estudos de espectros de íons produto e precursores originados a partir de íons selecionados em um primeiro estágio de análise de massas. Em MS/MS os íons gerados em um primeiro estágio da análise de massas são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), separados de acordo com sua relação massa/carga (*m/z*) e detectados. O estudo dos padrões de fragmentação mostrados no espectro de massas fornece informações sobre a presença de vários grupos funcionais. Estudos sistemáticos de padrões de fragmentação de substâncias puras levaram a diretrizes racionais para predição de mecanismos de fragmentação e a uma série de regras gerais que são úteis na interpretação dos espectros. Poucas vezes é possível, ou desejável, levar-se em conta todos os picos do espectro. Em vez disso, buscam-se padrões de fragmentação característicos. A identidade real do composto pode frequentemente ser estabelecida pela comparação do seu espectro de massas com os de compostos conhecidos até que um alto grau de coincidência seja conseguido (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

1.7.2. Caraterização do Material de Referência

De acordo com a norma ISO/ Guia 35, a caracterização de um material de referência é a determinação de um ou mais valores de propriedades químicas, físicas, biológicas ou tecnológicas relevantes ao uso pretendido. Quatro formas de caracterização de um material de referência são citadas pela ISO/ Guia 34. Normalmente, elas são empregadas

de diversas maneiras por organismos de certificação e produtores de MR, utilizando-se as seguintes formas de medições:

- por meio de um único método de medição (método primário), por um único laboratório;
- por dois ou mais métodos de referência independentes em um único laboratório;
- por um ou mais métodos de exatidão comprovada, realizadas por uma rede de laboratórios competentes;
- envolvendo uma rede de laboratórios competentes utilizando um método de medição específico, que fornece apenas os valores de propriedade específicos do método (ABNT, 2012).

1.8. Justificativa da proposta

Para a obtenção de resultados mais confiáveis, deve-se usar um MR de matriz semelhante à da amostra. Há uma escassez de MR na área de resíduos de medicamentos veterinários para matrizes alimentícias, o que dificulta o controle e a vigilância desses resíduos nos ovos. Não foram encontrados MR disponíveis para as análises de medicamentos veterinários em ovos, na base de dados internacional de materiais de referência certificados COMAR (2014). Apenas três MR foram encontrados para os ovos, no banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) (NIST, 2014): o SRM 1845, o SRM 8415 e SRM 8445, que foram certificados para o colesterol, elementos constituintes e proteínas alergênicas, respectivamente. O EPTIS é uma base de dados de provedores de ensaios de proficiência da América Central, América do Sul, Canadá, Caribe e 16 países da Europa. Pesquisando no banco de dados EPTIS, até março de 2014, o Progetto Trieste, na Itália, é o único provedor de ensaio de proficiência para análises de resíduos de coccidiostáticos em ovos. O MR desenvolvido por essa instituição tem como matriz o ovo liofilizado podendo conter como analitos a nicarbazina, a robenidina, a salinomicina, a narasina e/ou a lasalocida. (EPTIS, 2014; Progetto Trieste, 2014a).

Sendo assim, a proposta de se produzir um MR de anticoccidianos ionóforos poliéteres tendo o ovo como matriz é importante para que os laboratórios possam expandir seu escopo analítico, introduzindo esta análise na sua rotina e melhorar significativamente a confiabilidade das análises, contribuindo assim para o controle e vigilância destes resíduos em ovos. A produção de um MR, certificado ou não, requer um planejamento experimental detalhado, no qual deve ser prevista uma quantidade suficiente de material para a execução

de todos os estudos inerentes a ele. Basicamente, são três as etapas de trabalho para a produção de um MR: preparação, estudo de homogeneidade e estudo de estabilidade. Entretanto, um estudo de viabilidade permite avaliar a melhor forma de preparo do MR, o melhor método de homogeneização, as condições para garantir a estabilidade de transporte e armazenamento e a forma mais viável para caracterizá-lo.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é estudar a viabilidade da produção de um material de referência de salinomicina, anticoccidiano da classe dos ionóforos poliéteres, tendo o ovo como matriz.

2.1. Objetivos Específicos

1. Avaliar a melhor forma de preparo, tratamento e processamento da matriz para a produção do MR, visando à preservação das suas propriedades e composição durante o tempo requerido de estabilidade do candidato a MR, utilizando-se como técnicas de preservação a liofilização (*freeze - drying*) e a desidratação por atomização (*spray drying)*;

2. Definir as melhores condições, métodos de análise e técnicas estatísticas a serem empregados na avaliação dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização do material;

3. Realizar os estudos de homogeneidade e estabilidade de acordo com a norma ABNT ISO Guia 35:2012;

4. Definir as condições para garantir a estabilidade de transporte e armazenamento do MR;

5. Avaliar a possibilidade de alterações significativas nos níveis de resíduos de salinomicina em ovos pelo processo de desidratação por atomização (*spray drying)* em comparação ao processo de liofilização (*freeze – drying*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nos Apêndices A, B e C, encontram-se, respectivamente, as listas de vidrarias e materiais de laboratório, de padrões, reagentes, soluções e solventes e de equipamentos e acessórios utilizados neste trabalho.

3.1. Materiais

Neste trabalho, foram usados as seguintes amostras:

a) ovo desidratado Luz (Luz Alimentos, BRASIL);
b) ovo integral pasteurizado refrigerado Eggbox (Itaiquara, BRASIL);
c) ovo orgânico in natura tipo grande vermelho (Taeq, BRASIL).

3.2. Métodos

3.2.1. Teste para Determinação da Quantidade de Ovo a Ser Liofilizado por Frasco

Pesou-se em quadruplicata 2 g, 2,5 g, 3 g, 4 g, 5 g e 6 g, ao 0,1 mg, e em triplicata 10 g, ao 0,1 mg, de ovo orgânico homogeneizado em frascos de vidro âmbar previamente pesados. Os frascos foram armazenados em freezer a -70°C, por 12 h, para congelamento das amostras que a seguir foram liofilizadas por 24 h. A temperatura inicial e final do processo de liofilização foi, respectivamente, -98°C e -104°C e o vácuo foi de 87 µmHg. Após a liofilização, os frascos foram pesados novamente para calcular-se a massa de água perdida.

Foi feita uma avaliação visual quanto ao aspecto dos ovos liofilizados e realizaram-se testes de reconstituição, com e sem trituração, das amostras com diferentes massas.

A reconstituição das amostras foi realizada adicionando-se em cada frasco a quantidade de água perdida na liofilização, agitando-se em agitador tipo vórtex por 15 segundos e em agitador múltiplo de tubos por 1 minuto.

3.2.2. Caracterização do Padrão de Salinomicina por MS

Com auxílio de uma bomba de seringa, foi feita uma infusão da solução de 100 ng/mL de salinomicina em MeOH: 0,1% FOA em H_2O (80:20, v/v) no modo eletrospray positivo (ESI+) no espectrômetro de massas triplo quadrupolo. Foram empregados os modos de aquisição varredura total, com o objetivo de determinar o íon precursor e, varredura de íons produto, para identificar os íons produtos, resultantes do íon precursor, utilizados na identificação da salinomicina.

3.2.3. Preparação do Candidato à Material de Referência

3.2.3.1. Fortificação da Amostra

Foram adicionados 10 mL de solução de SAL na concentração de 1 μg/mL a 2 kg de ovo integral pasteurizado, previamente analisado e constatado a ausência de salinomicina, a fim de obterem-se 5 μg/kg de SAL no produto final. Agitou-se com auxílio de um bastão de vidro, e homogeneizou-se por 1 h, utilizando-se o misturador de alta dispersão na velocidade de 3000 rpm. Analisou-se o material fortificado para determinar se a concentração de salinomicina estava no nível desejado, conforme o método descrito no item 3.2.6. As amostras foram injetadas em duplicatas. Também foi determinado o teor de umidade na amostra fortificada, de acordo com o método descrito no item 3.2.5., para se calcular o rendimento dos processos utilizados no preparo dos materiais.

O produto fortificado foi distribuído em porções de aproximadamente 130 g em 8 recipientes plásticos do tipo “tupperware” e congeladas a -70ºC por 12 h para serem liofilizadas posteriormente. Todos os recipientes foram pesados vazios e após a adição da amostra, antes de serem congelados, para se calcular a eficiência do processo de liofilização. O restante do produto, aproximadamente 1 Kg, foi armazenado também a -70ºC para os testes no *spray dryer*.

3.2.3.2. Liofilização da amostra fortificada por liofilização e envase

As 8 porções de amostra fortificada foram liofilizadas sendo que 4 por vez, devido à capacidade do liofilizador, o que originou dois lotes de produtos. A liofilização de cada lote

ocorreu por 40 h e as condições de liofilização foram: temperatura inicial a -99 ºC, temperatura final a – 102 ºC e vácuo a 44 μmHg.

As amostras liofilizadas foram trituradas com auxílio de gral e pistilo, homogeneizadas utilizando-se a rotação de um rota-vapor com agitação de 25 rpm e vácuo de 600 mmHg, à temperatura ambiente por 1 h. O produto homogeneizado foi distribuído em porções de aproximadamente 0,8 g, por meio de uma colher de medida, em frascos de vidro âmbar de capacidade de 10 mL em sala desumidificada. Após a pesagem, os frascos foram vedados utilizando-se o sistema de fechamento de frascos sob vácuo do liofilizador e, posteriormente, lacrados com selo de alumínio. Três frascos de cada lote do material produzido, representando início, meio e fim da pesagem, foram separados para determinação do teor de umidade e sólidos totais, para avaliar se houve aumento de umidade durante o envase das amostras. A umidade e o teor de sólidos totais destas amostras foram medidos de acordo com o método descrito no item 3.2.5.

3.2.3.3. Desidratação da Amostra Fortificada no Mini Spray Drying e seu Envase

Diluiram-se 600 mL da amostra fortificada obtida em 3.2.3.1. com água tipo I em balão volumétrico de 2000 mL, na proporção de 30:70, v/v. Separaram-se 3 alíquotas de 400 mL da amostra diluída para desidratação em Mini *Spray Dryer*. O volume das alíquotas foi definido de acordo com a capacidade máxima do equipamento por processo. Cada alíquota foi homogeneizada em dispersor Ultra-Turrax ® T 25 baisc, na velocidade de 6500 rpm por 3 minutos, para quebra de grumos provenientes do ovo. Após a homogeneização, as alíquotas foram desidratadas em Mini *Spray Dryer,* de acordo com as condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de Operação do Processo de Desidratação por Mini *Spray Dryer*.

Lotes	*Temperatura de entrada (ºC)*	*Temperatura de saída (ºC)*	*Aspirador (%)*	*Bomba (%)*	*Q-flow*[2] *(mm)*
3	150	68	80	20	35
4	120	63	80	20	35
5	180	71	80	20	35

O produto obtido foi distribuído, por meio de pesagem, em porções de 0,5 g em frascos de vidro âmbar de capacidade 10 mL, em ambiente desumidificado, para posterior

[2] O Q-flow é a válvula de ajuste de vazão de fluxo de ar do interior do atomizador.

avaliação da homogeneidade e estabilidade dos lotes produzidos. Após a pesagem, os frascos foram vedados utilizando-se o sistema de fechamento de frascos sob vácuo do liofilizador e, posteriormente, lacrados com selo de alumínio. Três frascos de cada lote do material produzido, representando início, meio e fim da pesagem, foram separados para determinação do teor de umidade, para avaliar se houve aumento de umidade durante o envase das amostras. A umidade e o teor de sólidos totais destas amostras foram medidos de acordo com o método descrito no item 3.2.5.

3.2.4. Verificação de Vácuo

Logo após a vedação dos frascos utilizando-se o sistema de fechamento de frascos sob vácuo do liofilizador, foi realizada a verificação de vácuo dentro de cada frasco, aplicando uma centelha elétrica em cada um, por meio da utilização de uma bobina de Tesla, que faz com que os gases contidos no interior do frasco se ionizem, gerando uma coloração lilás, indicando que o MR está em atmosfera a vácuo.

3.2.5. Determinação da Umidade Residual e de Sólidos Totais

Três frascos de cada lote foram utilizados para a determinação da umidade residual por perda por dessecação pela secagem direta em estufa a 105ºC, pelo procedimento descrito pelo manual Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (método 012/IV) (IAL, 2008).

Considerou-se como teor de sólidos totais, o valor calculado da subtração de 100% da amostra menos o valor percentual da umidade encontrado na amostra.

3.2.6. Método de Análise para a Determinação da Concentração de Salinomicina

Utilizou-se um método analítico baseado na extração com solvente e determinação pela técnica de LC-MS/MS desenvolvida e validada pelo Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos do INCQS/ Fiocruz (SPISSO et al, 2010a). Esse método foi empregado na análise das amostras para a avaliação de amostras branca e fortificada e também nos estudos de homogeneidade e estabilidade.

O procedimento de extração consiste na adição de ACN a 2 g de amostra de ovo integral homogeneizado e fortificado com 50 μL da solução do padrão interno de nigericina (NIG) a 0,6 μg/mL. Para amostras de ovo em pó, utilizou-se 0,5 g de amostra (equivalentes a 2 g da amostras reconstituída) adicionadas de 1,5 mL de água, homogeneizadas com agitador tipo Vórtex e fortificadas da mesma forma. As amostras foram então agitadas vigorosamante por 30 min em uma mesa agitadora reciprocante a 240 rpm e centrifugadas a 12.000 x *g* por 5 min a 4 ºC. Uma alíquota de 250 μL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e evaporada à secura sob um fluxo suave de nitrogênio a 46-48 ºC. O resíduo seco foi reconstituído com 1 mL de solução de 0,5 mmol L^{-1} de NaOAc:MeOH (70:30, v/v). Agitou-se por 15 s em vórtex e filtrou-se com um filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno de 0,22 μm em um frasco de vial âmbar para injeção automática de amostras. Um volume de 5 μL desse extrato foram injetados no cromatógrafo para determinação da concentração de anticoccidianos pela técnica de LC-MS/MS.

Na análise cromatográfica, foi utilizada uma taxa de 0,3 mL/min a 35 ºC e a temperatura do autoinjetor de amostras a 4ºC. Como fases móveis foram utilizadas soluções de H_2O, MeOH e ACN, todas com 0,1% de ácido fórmico (FOA).

Para a espectrometria de massas, utilizou-se fonte eletrospray operada no modo positivo e modo de aquisição MRM para 3 transições, sendo a primeira transição o íon base utilizada para fins quantitativos. As duas outras transições foram utilizadas para a confirmação do analito. Os picos cromatográficos foram integrados com o algoritmo IntelliQuan® no software Analyst ®. Uma proporção sinal-ruído dos picos iguais ou maiores do que 3:1 foi necessária para detecção. As concentrações das amostras foram calculadas a partir de curvas de calibração.

3.2.7. Estudo de *Homogeneidade dos Lotes*

A norma ISO/Guia 35 recomenda que o número mínimo de frascos selecionados ao acaso se situe entre 10 e 30, ou seja, recomenda-se não ser menor que 10. Para determinar o número mínimo de unidades de amostras por lote (*n*) a ser utilizada para o estudo de homogeneidade, utilizou-se a fórmula $n = 3.\sqrt[3]{N}$, sendo N, o número de unidades no lote, baseando-se no documento “Methods for sampling chemical products” da *British Standards Institution* (BSI, 1976).

A seleção dos frascos utilizados no estudo de homogeneidade foi feita de forma aleatória, por meio de sorteio. Segundo a norma ISO Guia 35, o plano de amostragem

aleatória fornece, normalmente, um subconjunto que pode ser considerado representativo para todo o lote.

As amostras selecionadas foram analisadas de acordo com o método descrito na seção 3.2.6 e as medições foram feitas em triplicatas de injeção em ordem aleatória, com a finalidade de distinguir alguma tendência no lote de amostras, assim como recomendado pela ISO Guia 35. A subamostragem dos itens não foi realizada por razões econômicas. As medições foram realizadas em condições de repetitividade.

Os dados obtidos foram verificados para *outliers* utilizando o teste de Grubbs e a análise de regressão foi realizada para detectar possíveis tendências a respeito da sequência de enchimento dos frascos ou a sequência analítica. A análise de variância de um fator (ANOVA) foi realizada para estimar a contribuição da incerteza de uma possível heterogeneidade. Isso foi conseguido pela quantificação da variação entre os frascos (S^2_{bb}), de acordo com a Equação (1).

$$S^2_{bb} = \frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n} \qquad \text{Equação (1)}$$

Em que:

n = número de replicatas;

MQ = média dos quadrados.

De acordo com a ISO Guia 35, neste planejamento, o efeito da homogeneidade entre frascos é incluído na variância MQ_{entre}, bem como quaisquer efeitos que surjam da transformação da amostra. A variância MQ_{dentro} cobre somente a repetitividade da medição.

O grau de heterogeneidade que pode ser detectado com um dado método é limitado pela repetição deste método. Portanto, um terceiro parâmetro (u_{bb}), que reflete a heterogeneidade máxima que pode ser escondido por um método de repetição, foi calculado pela Equação (2), como descrito na ISO Guia 35. O maior dos dois valores S_{bb} e u_{bb} foi então tomado como uma estimativa conservadora para a contribuição da incerteza devido à possível heterogeneidade (u_{bb}).

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQdentro}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{gl\ do\ MQdentro}} \qquad \text{Equação (2)}$$

Em que:

MQ = média dos quadrados;
gl = grau de liberdade.

3.2.8. Avaliação da Equivalência entre os Lotes dos Materiais Liofilizados

Dois lotes do material de referência liofilizado foram produzidos separadamente, porém da mesma forma, devido à capacidade máxima do liofilizador. Entretanto, como os processos de liofilização, moagem e envase ocorreram em momentos diferentes, poderia haver diferenças significativas entre esses lotes inerentes ao processamento. Portanto, houve necessidade de se verificar a equivalência entre esses lotes, a fim de se fazer apenas um único estudo de estabilidade e de caracterização para esses materiais. Dessa forma, a equivalência dos lotes foi avaliada estatisticamente, aplicando-se o Teste *F,* de *Fisher*, e o Teste *t,* de *Student*, às médias das medições realizadas nos estudos de homogeneidade destes lotes.

3.2.9. Avaliação de Alterações Significativas no Nível de Salinomicina no Ovo pelos Processos de Desidratação por Spray Drying e Liofilização.

Esta avaliação foi realizada comparando-se a concentração de salinomicina da amostra fortificada com as concentrações das amostras dos lotes produzidos por liofilização e desidratação por *spray drying*. Para esse experimento, foram realizadas as análises conforme o método descrito na seção 3.2.6, em triplicata de extração e injeção.

Os resultados obtidos em ambos os testes foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), Teste F e Teste *t*. Calculou-se também o % de recuperação da salinomicina nas amostras.

3.2.10. Estudo de Estabilidade de Curta Duração

O estudo de estabilidade de curta duração que simula as condições de transporte foi realizado em três temperaturas distintas: -20 ºC (freezer), 25 ºC (ambiente), e 50 ºC (estufa), em um período de quinze a trinta dias. A Tabela 2 mostra as condições desse estudo para

cada lote. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, foi utilizado o modelo isócrono.

Assim como no estudo de homogeneidade, as amostras selecionadas foram analisadas de acordo com o método descrito na seção 3.2.6 e as medições foram feitas em condições de repetitividade, em triplicatas de injeção em ordem aleatória. Os resultados foram avaliados considerando como valor de referência as concentrações de salinomicina das amostras armazenadas a -70 ºC, condição essa em que se acredita não haver nenhum tipo de alteração na amostra e na concentração da salinomicina.

Tabela 2. Condições dos Estudos de Estabilidade de Curta Duração dos Lotes Produzidos

Lotes	*-20°C*	*Temperatura ambiente (25°C)*	*50°C*
Lote 1 – liofilizado	15 dias	15 dias	15 dias
Lote 2 – liofilizado	30 dias	30 dias	----------
Lote 3 - *spray drying*	30 dias	30 dias	----------
Lote 4 - *spray drying*	30 dias	30 dias	----------
Lote 5 - *spray drying*	30 dias	30 dias	----------

A primeira etapa na avaliação dos dados de um estudo de estabilidade consiste em verificar se pode ser observada qualquer tendência na concentração do analito ao longo do tempo. Essa avaliação é realizada pela análise de regressão linear simples para verificação da relação entre as duas variáveis, concentração versus tempo. De acordo com a norma ISO Guia 35, no caso de pequenos problemas de instabilidade em que o mecanismo cinético subjacente é desconhecido, uma aproximação linear constitui um modelo adequado. Nos casos em que um mecanismo bem definido é a razão para a instabilidade, tal modelo deve ser preferido ao modelo linear. O critério de avaliação da análise de tendência para o estudo de estabilidade, para o modelo linear, é que a inclinação seja insignificante (ABNT, 2012).

A avaliação estatística para verificar a significância da regressão das concentrações durante o intervalo de tempo estudado foi feita de duas formas: pelo teste *F*, de *Fisher*, e pelo teste *t,* de *Student*. No primeiro caso, avaliamos a significância estatística da inclinação (termo contendo o regressor). No segundo caso, verificamos a significância estatística do parâmetro que multiplica o regressor. Ambos os testes levam à mesma conclusão. Utilizou-se aqui 5% como nível de significância. Caso o parâmetro ligado ao regressor não seja significativo, dizemos que o material é estável (ABNT, 2012).

Os pares de média foram comparados usando a análise de variância de fator único e teste LSD de Fisher.

3.2.11. Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica pela Determinação Direta do Valor de Ácido Tiobarbitúrico

Para avaliação do grau de oxidação lipídica das amostras de MR-SAL liofilizadas, utilizadas nos estudos de estabilidade de curta duração, foi utilizado o método descrito por Tarladgis et al (1960) adaptado por Maia (1980). Esse método baseia-se no princípio da reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com produtos da oxidação de lipídeos formando um complexo de coloração rósea que pode ser determinado por espectrofotometria a 538 nm resultando no índice de TBA.

3.2.12. Planejamento do Estudo de Estabilidade de Longa Duração

Foram definidas as temperaturas e os tempos de armazenamento a serem investigados no estudo de estabilidade de longa duração baseando-se em informações relacionadas à estabilidade da matriz e do analito, além das recomendações da ISO Guia 35 e de outros estudos realizados em materiais de referência e controle de qualidade de matriz ovo encontrados na literatura.

De acordo com a ISO Guia 35, a estabilidade a longo prazo está relacionada à instabilidade remanescente dos valores de propriedade do MRC sob condições de armazenamento especificadas. Normalmente, os estudos de estabilidade levam entre 24 a 36 meses para serem realizados, com, tipicamente, 5 a 6 pontos no tempo. Assim são necessários, pelo menos, de 10 a 12 frascos para cada temperatura (ABNT, 2012).

Da mesma forma que nos estudos de homogeneidade e estabilidade de curta duração, é preferível que um estudo de estabilidade em uma certificação de lote seja realizado em condições de repetitividade (ABNT, 2012). Portanto, foi estabelecido que a avaliação da estabilidade de longa duração será realizada empregando-se o planejamento isócrono e o modelo clássico será empregado para um monitoramento da estabilidade do material para se obter informações durante o tempo de vida útil do MR.

3.2.13. Caracterização do Candidato a Material de Referência

Como este trabalho trata de um estudo de viabilidade da produção de um determinado material de referência, a etapa de caracterização foi apenas planejada. O planejamento da forma de caracterização para o MR-SAL baseou-se em pesquisas de metodologias para a determinação de salinomicina em ovos, por meio de levantamento bibliográfico, e também de pesquisas com outros laboratórios da área, com o objetivo de saber se estes possuem interesse em participar da etapa de caracterização para este material.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do Teste de Determinação da Quantidade de Ovo a Ser Liofilizado por Frasco

Os frascos contendo 10 g de amostra quebraram durante o congelamento a -70°C devido à expansão do volume. Portanto, não foi possível liofilizar 10 g de amostras nesses frascos de 10 mL.

Através da Figura 2 pode-se observar que a amostras de 2 e 4 g de ovo liofilizado apresentam aspecto mais seco do que as amostras contendo 5 e 6 g, sendo a última com aspecto bem mais úmido que as outras.

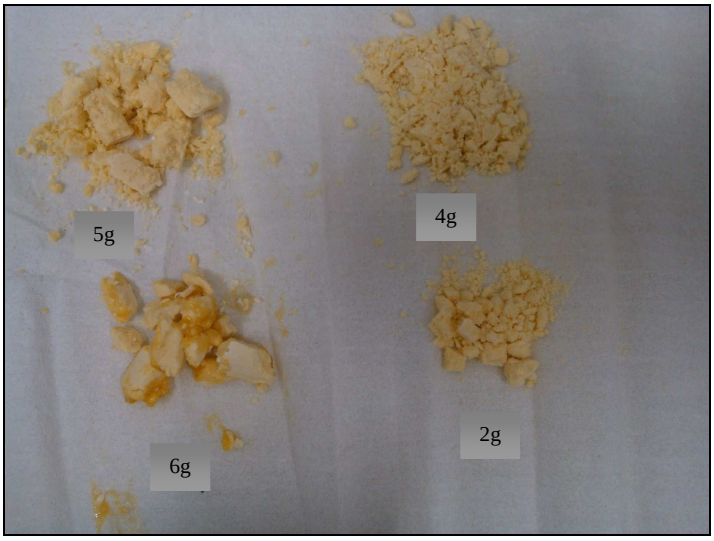


Figura 2: Amostras de 2, 4, 5 e 6 g de ovo liofilizado.

Calculando-se o percentual médio teórico de água perdida das amostras liofilizadas, percebeu-se que as amostras contendo de 2 a 4 g perderam de 76 a 76,3% de água e as com 5 e 6 g, 75,2% e 75,6%, conforme observado no Apêndice D. Sendo assim, percebe-se que a liofilização ocorreu de forma eficiente, pois o teor de umidade perdida pelas amostras liofilizadas aproximou-se do valor declarado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, que é de 75,6% de umidade (TACO, 2011).

Na tentativa de reconstituir as amostras liofilizadas com as devidas massas de água perdidas, observou-se a formação de grumos. Um material de referência de ovo liofilizado fornecido pelo Progetto Trieste, um provedor de ensaio de proficiência italiano, recomenda a reconstituição de 1 g de ovo liofilizado com 3,29 g de água, agitação em vórtex por 15 minutos e repouso a 4°C por "*over night*" para usar no dia seguinte. As amostras reconstituídas foram então deixadas em repouso por 24 horas sob refrigeração em torno de

4°C e não houve alteração no aspecto, como pode ser visto na Figura 3 (Progetto Trieste, 2014b).

Outra parte das amostras liofilizadas foi triturada em almofariz com auxílio de um pistilo, onde se obteve um pó bem fino, conforme pode ser observado na Figura 4. Reconstituíram-se as amostras trituradas e obteve-se um líquido viscoso e homogêneo para as amostras de 2, 2,5 e 3 g de ovo, e as amostras contendo 4, 5 e 6 g apresentaram grumos. Estas amostras foram deixadas em repouso por 24 h sobre refrigeração em torno de 4°C e obtiveram um aspecto homogêneo e sem grumos, como mostrado na Figura 5.

Através dos resultados obtidos pode-se chegar a perceber que a massa máxima de ovo a ser liofilizada em frascos de vidro de 10 mL deve ser de 4 g.

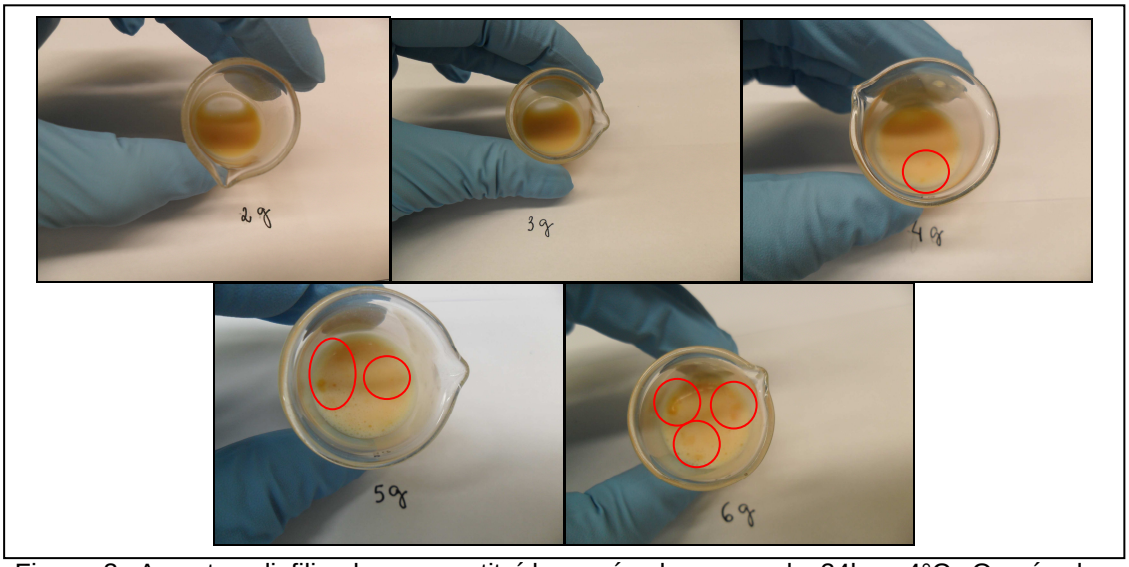


Figura 3. Amostras liofilizadas reconstituídas após descanso de 24h a 4°C. Os círculos vermelhos mostram os grumos formados.

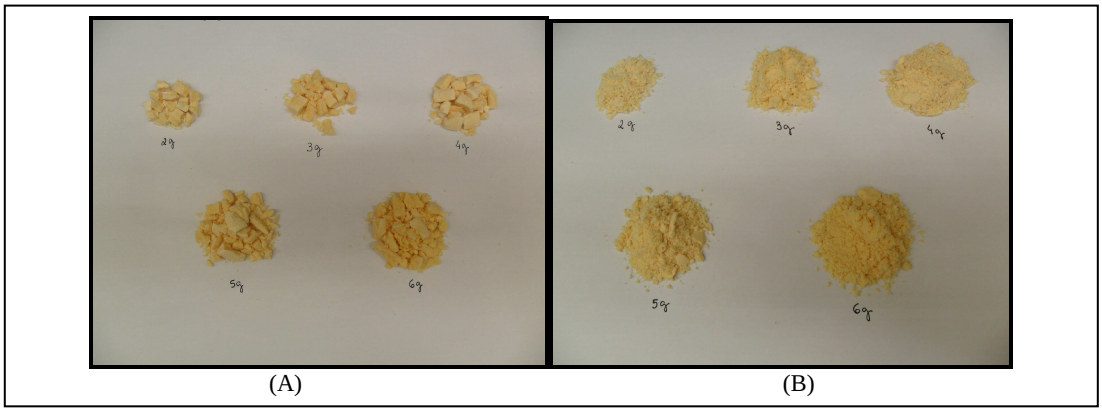


Figura 4. Pedaços das amostras liofilizadas (A) e amostras liofilizadas e trituradas (B).

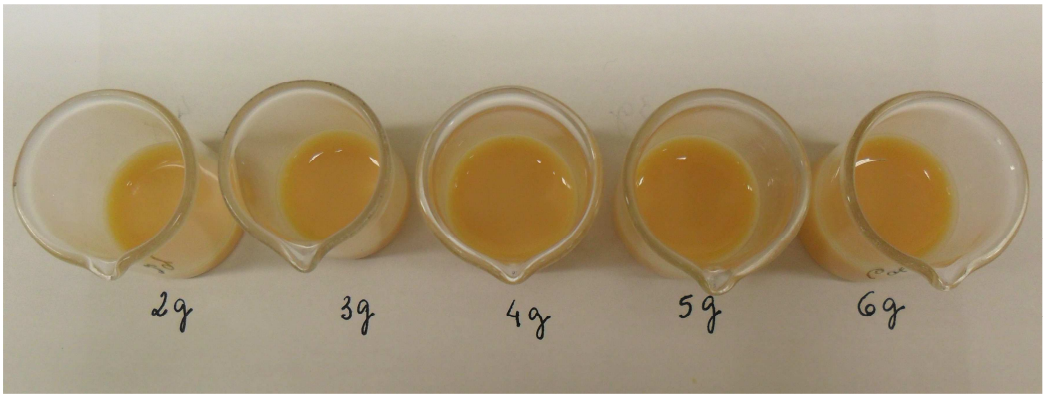


Figura 5. Amostras liofilizadas e trituradas reconstituídas após 24 h sob refrigeração de 4°C.

Com a melhor reconstituição do ovo nas amostras que foram trituradas, percebe-se que uma liofilização direta para posterior trituração e pesagem nos frascos seria mais conveniente do que o preparo do material de referência liofilizando o ovo já pesado nos frascos.

Outra forma de se preparar ovo em pó é utilizando o processo de desidratação por *spray drying* como método de conservação no lugar da liofilização, pois dessa forma, o produto já seria obtido na forma de pó, não sendo necessária a trituração do mesmo.

4.2. Caracterização do Padrão por MS

Foram obtidos os espectros de massas da salinomicina nos modos varredura total e varredura de íons produtos, como pode ser observado, respectivamente, nas Figuras 6 e 7. A salinomicina apresentou íon precursor $[M+Na]^+$ *m/z* 773 e no modo varredura de íons produtos foram obtidos os íons produtos de *m/z* 531, 431 e 265, fragmentos também observados por Miao; March e Metcalfe (2003), Martínez-Villalba; Moyano e Glaceran (2009) e Shao et al (2009).

A salinomicina possui um grupo cetona e além das perdas neutras de CO_2 e H_2O, fragmentações decorrentes de reações de clivagem beta em ambos os lados da cadeia alquílica (carboxila e hidroxila) foram observadas, assim como por outros autores. (Miao; March; Metcalfe, 2003; Martínez-Villalba; Moyano; Glaceran, 2009 e Shao et al, 2009). As principais fragmentações da salinomicina estão ilustradas na Figura 8.

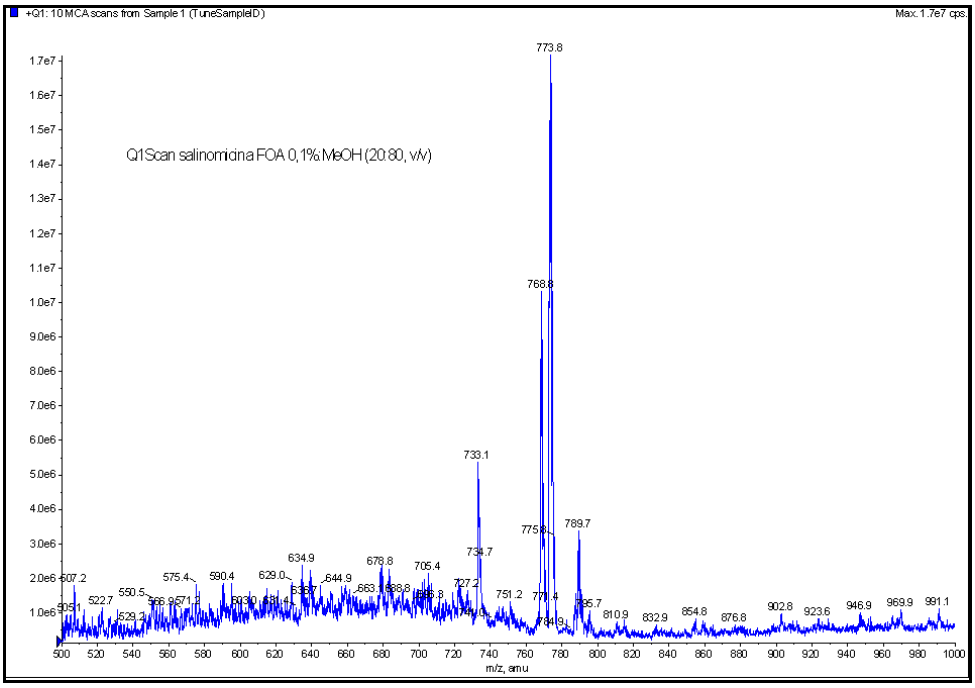


Figura 6. Espectro de massas da salinomicina (*m/z* 773) no modo de aquisição varredura total.

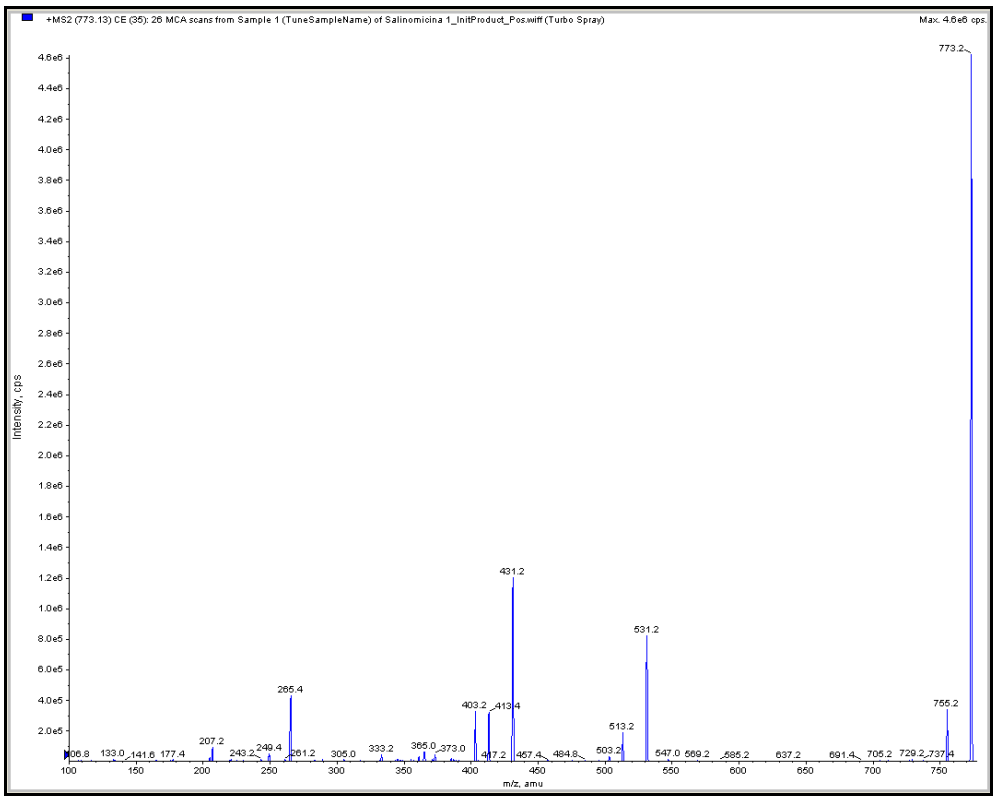


Figura 7. Espectro de íon produto da salinomicina (*m/z* 773).

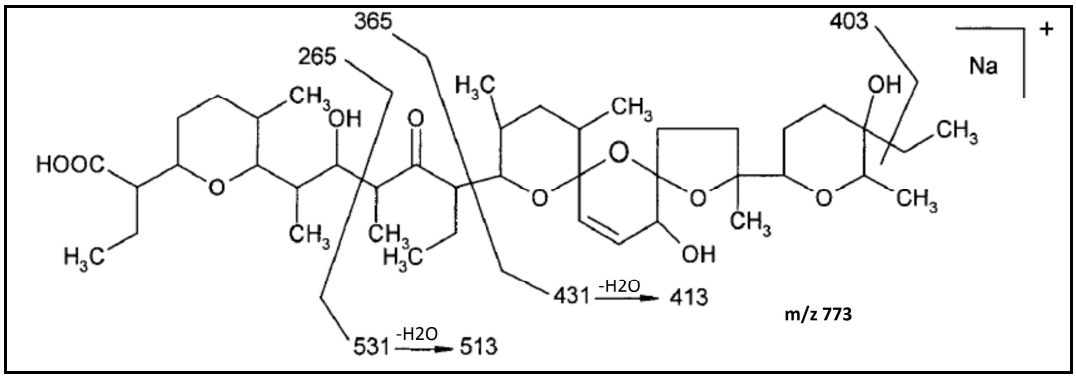


Figura 8. Principais fragmentações do íon precursor da salinomicina $[M+Na]^+$ (*m/z* 773).

4.3. Avaliação da Amostra Fortificada

4.3.1. Quanto à Concentração de Salinomicina

Comparando-se os cromatogramas obtidos das amostras original e depois da fortificação, ilustrados na Figura 9, foi possível a identificação da salinomicina na amostra fortificada. O cromatograma da amostra original não apresentou sinais de presença de salinomicina, demonstrando ser uma amostra branca. Para a análise quantitativa da concentração de salinomicina na amostra fortificada, obtiveram-se as concentrações de 4,71 μg/Kg e 4,86 μg/Kg, respectivamente, para a primeira e segunda injeção da amostra, fornecendo um valor médio de 4,78 μg/Kg. Os resultados da análise quantitativa mostraram que a concentração de salinomicina na amostra fortificada estava bem próxima ao nível desejado de 5 μg/Kg, o que indica que o procedimento de fortificação da amostra está adequado para o preparo do material de referência.

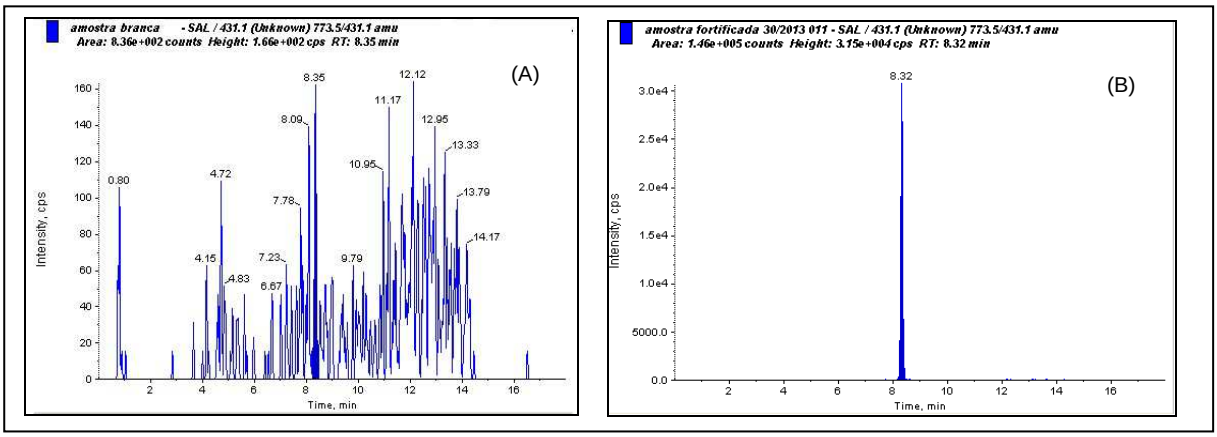


Figura 9. Cromatogramas de íon extraído da amostra original (A) e da amostra fortificada com salinomicina (B), apresentando a transição de quantificação *m/z* 773.5/431.1.

4.3.2. Quanto ao Teor de Umidade e Sólidos Totais

Os resultados encontrados na determinação do teor de umidade e de sólidos totais estão na Tabela 3. A amostra apresentou valores médios de umidade e sólidos totais de, respectivamente, 76,60% e 23,40%. Esses valores estão de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, que declara 75,6% de umidade para o ovo de galinha inteiro (TACO, 2011). Os coeficientes de variação inferiores a 0,1 indicam excelentes qualidade dos pontos experimentais.

Tabela 3. Resultados da Análise de Umidade e Sólidos Totais na Amostra de Ovo Liofilizado Fortificada.

Amostra	% Umidade	% Sólidos Totais
1	75,88	24,12
2	77,81	22,19
3	76,12	23,88
Média	**76,60**	**23,40**
Desvio-padrão	1,05	1,05
Coef. Variação	0,01	0,04

4.4. Avaliação dos Lotes Produzidos por Liofilização

Foram obtidos dois lotes do material de referência, que foram denominados de lote 1 e lote 2. A eficiência do processo de liofilização foi calculada com base no percentual de água sublimada, conforme a Equação 3, e o rendimento do processo foi avaliado em relação ao teor de umidade na amostra original, de acordo com a Equação 4. Os resultados de eficiência e rendimento dos processos de liofilização dos lotes produzidos estão na Tabela 4. Foram obtidos excelentes rendimentos, indicando que não houve perda de amostra significativa pelo processo de liofilização. Os coeficientes de variação inferiores a 0,1 indicam excelentes qualidade dos pontos experimentais.

$$\text{Eficiência do processo (\%)} = \text{água sublimada (\%)} = \frac{\text{massa sublimada}}{\text{massa de ovo}} \times 100 \qquad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{\% água sublimada}}{\text{\% umidade na amostra antes da liofilização}} \times 100 \qquad \text{Equação (4)}$$

Tabela 4. Eficiência e Rendimentos dos Processos de Liofilização dos Lotes 1 e 2

	Lote 1		***Lote 2***	
Recipiente	**Eficiência (% água sublimada)**	**Rendimento (%)**	**Eficiência (% água sublimada)**	**Rendimento (%)**
1	76,34	99,66	76,36	99,69
2	76,49	99,85	76,51	99,87
3	76,52	99,89	80,77	105,44*
4	76,51	99,88	76,51	99,88
Média	**76,47**	**99,82**	**77,54**	**99,81**
Desvio-padrão	0,08	0,11	2,16	0,11
Coef. Variação	0,0011	0,0011	0,0278	0,0011

*valor excluído.

Os lotes 1 e 2 geraram, respectivamente, 138 e 137 frascos. Com relação à presença de vácuo dentro dos frascos, o lote 1 apresentou 2 frascos sem vácuo e estes foram descartados, restando assim 136 frascos no total. No lote 2, todas as amostras apresentaram vácuo dentro dos frascos. Esses resultados mostraram que o sistema

empregado para o fechamento dos frascos foi satisfatório para armazenar as amostras a vácuo.

4.5. Avaliação dos Lotes Produzidos por Desidratação por *Spray Drying*

Foram obtidos três lotes do material de referência, denominados de lotes 3, 4 e 5, produzido por desidratação por *spray drying* em diferentes temperaturas, conforme apresentado na Tabela 1. O rendimento do processo de *spray drying* foi calculado em relação à quantidade de sólidos totais na amostra original. Considerou-se o teor de sólidos totais o valor calculado através da subtração de 100% da amostra menos o valor percentual da umidade encontrada na amostra original, descrito no item 4.1.2. Dessa forma, o teor de sólidos totais considerado para a amostra original foi de 23,40%.

Para o cálculo do rendimento também se levou em conta a diluição da amostra (600 mL de amostra + 1400 mL de água, volume total de 2000 mL), a densidade da amostra antes da diluição (1,034 g/mL) e o volume de amostra diluída utilizado em cada processo (400 mL). Como para o processamento de todos os lotes partiu-se da mesma solução diluída e utilizou-se o mesmo volume de solução, o valor de sólidos totais calculado para a solução alimentadora foi de 29,03 g. As fórmulas utilizadas para a obtenção desse valor estão descritas nas Equações 5, 6 e 7.

$$\text{Massa utilizada de amostra (g)} = \frac{\text{densidade da amostra (g/mL)}}{\text{volume de amostra (mL)}} \qquad \text{Equação (5)}$$

$$\text{Quantidade de sólidos na solução diluída (g)} = \frac{\text{massa utilizada de amostra (g)} \times \text{\% de sólidos totais}}{100} \qquad \text{Equação (6)}$$

$$\text{Quantidade de sólidos da solução alimentadora por processo (g)} = \frac{\text{quantidade de sólidos na solução diluída (g)} \times \text{volume utilizado na solução diluída (mL)}}{\text{volume total da solução diluída (mL)}} \qquad \text{Equação (7)}$$

Para calcular o rendimento de cada processo, utilizou-se a fórmula descrita na Equação 8. Os resultados dos rendimentos de cada lote produzido estão na Tabela 5. Pode-se perceber que houve perdas de amostra pelo processo de *spray drying* em todas as condições testadas neste trabalho. A condição de maior temperatura (180ºC) foi a que forneceu um rendimento maior de produto. Para as temperaturas de 150ºC e 120ºC foram

obtidos rendimentos próximos. Porém, cabe ressaltar que cada processo só foi testado apenas uma vez, o que não permite uma conclusão de relação de aumento e/ou diminuição de temperatura com maior ou menor rendimento.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa de ovo em pó obtida por processo}}{\text{\% sólidos totais na solução alimentadora por processo}} \times 100 \qquad \text{Equação (8)}$$

Tabela 5. Rendimentos dos Processos de *Spray Drying* dos Lotes 3, 4 e 5.

Lote	**Quantidade de ovo em pó obtido (g)**	**Rendimento (%)**
3 (150ºC)	16,4247	56,58
4 (120ºC)	16,8151	57,92
5 (180ºC)	18,7873	64,72

Cada lote levou em média uma hora e meia para serem produzidos levando-se em consideração o tempo de estabilização da temperatura, coleta do produto obtido e limpeza do equipamento. Os lotes 3, 4 e 5 geraram, respectivamente, 33, 34 e 37 frascos. Todos os frascos de ambos os lotes apresentaram resultados satisfatórios quanto à presença de vácuo dentro dos frascos, confirmando assim a adequação do sistema de fechamento dos frascos.

4.6. Determinação da Umidade Residual e de Sólidos Totais dos Lotes Produzidos

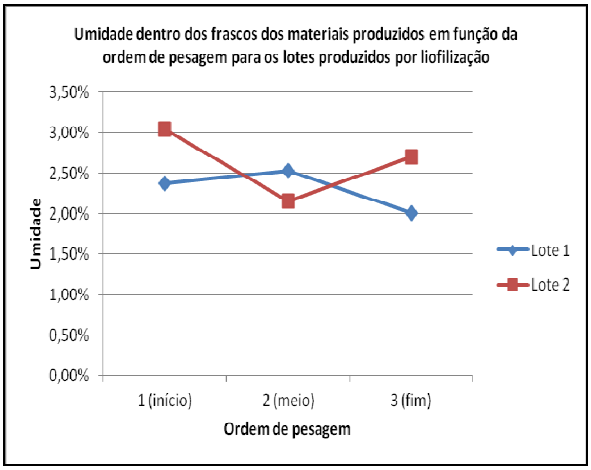
Os resultados das análises dos MR produzidos apresentaram valores médios de 0,79 % a 2,63 % para umidade e 97,37% a 99,21% para sólidos totais. Esses resultados estão em conformidade com a especificação, estabelecida pela Portaria Nº 1, de 21 de fevereiro de 1990 do MAPA, que determina mínimo de 96,0 % de sólidos totais para ovo integral desidratado (BRASIL, 1990). Dessa forma, os valores de umidade e sólidos totais obtidos para todos os lotes produzidos demonstraram que ambos os processos, liofilização e desidratação por *spray drying*, foram eficientes.

Os materiais de referência produzidos por *spray drying* apresentaram umidades médias menores que os produzidos por liofilização, demonstrando uma eficiência melhor do processo de *spray drying* em relação à eliminação de água. Os resultados das análises de umidade e sólidos totais para todos os lotes produzidos, tanto por liofilização como por *spray drying*, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado das Análises de Umidade e Sólidos Totais para os Lotes Produzidos.

Alíquota	***Lote 1***		***Lote 2***		***Lote 3***		***Lote 4***		***Lote 5***	
	Umidade	***Sólidos Totais***	***Umidade***	***Sólidos Totais***	***Umidade***	***Sólidos Totais***	***Umidade***	***Sólidos Totais***	***Umidade***	***Sólidos Totais***
1 (início)	2,37 %	97,63 %	3,04 %	96,96 %	2,75 %	97,25 %	0,40 %	99,60 %	0,60 %	99,40 %
2 (meio)	2,53 %	97,47 %	2,15 %	97,85 %	0,81 %	99,19 %	1,21 %	98,79%	1,40 %	98,60 %
3 (final)	2,01 %	97,99 %	2,70 %	97,30 %	1,09 %	98,91 %	0,77 %	99,23%	0,37 %	99,63 %
Média	**2,30 %**	**97,70 %**	**2,63 %**	**97,37 %**	**1,55 %**	**98,45 %**	**0,79 %**	**99,21%**	**0,79 %**	**99,21 %**
Desvio-padrão	0,0027	0,0027	0,0045	0,0045	0,0105	0,0105	0,0041	0,0041	0,0054	0,0054

Pelos valores de umidade encontrados nas alíquotas representativas do início, meio e final da etapa de envase dos lotes produzidos, percebe-se que não houve ganho de umidade durante a pesagem das amostras nos frascos. Isso pode ser mais bem visualizado pelos gráficos ilustrados na Figura 10. Esses resultados indicam que o ambiente desumidificado não permitiu que houvesse aumento da umidade nas amostras durante a pesagem.



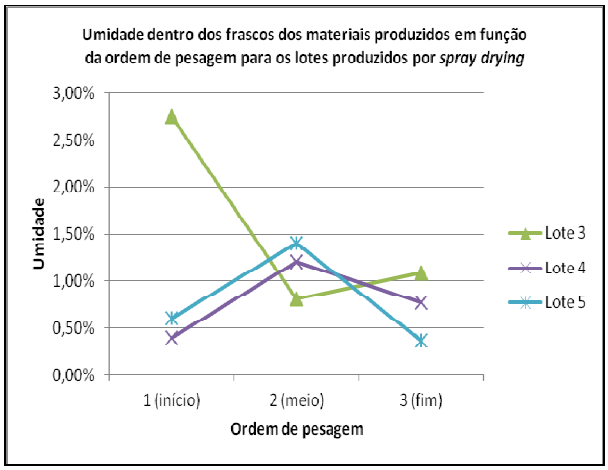


Figura 10. Gráficos dos valores de umidade dentro dos frascos dos materiais de referência produzidos em função da ordem de pesagem dos frascos.

4.7. Estudo de Homogeneidade

Os resultados das medições da concentração de salinomicina para os estudos de homogeneidade encontram-se no Apêndice E.

Os gráficos de tendência devido a desvios nas medições de cada lote, realizadas em triplicatas de injeção em ordem aleatória, e os gráficos de tendências devidas à preparação dos lotes de amostras estão ilustrados, respectivamente, nas Figuras 11 e 12.

A Tabela 7 indica o valor-P das análises de variância para regressão linear para uma possível tendência nas medições e para uma possível tendência nos lotes produzidos. Para os lotes 1, 2 e 5, obteve-se o valor-P < 0,05, indicando que houve tendência na medição das amostras desses lotes, demonstrando repetitividade insuficiente do método de medição. Porém, conforme descrito pela ISO Guia 35, uma tendência nos resultados da medição é algo que pode ser corrigido, independentemente de ela ser estatisticamente significativa ou não. Um método para o desenvolvimento de uma correção para um desvio de instrumento, segundo a própria norma, consiste na inclusão de uma amostra de controle da qualidade que possa ser inserida, diretamente, no instrumento. Na avaliação de tendência nos lotes, o valor-P > 0,05 obtido para todos os lotes indica que a regressão é insignificante, e, dessa forma, todos os lotes estão adequados para certificação.

Gráficos de controle de média e amplitude também foram elaborados para a avaliação de tendências, tanto devido a desvios nas medições de cada lote, quanto devido à preparação dos lotes, sendo ilustrados, respectivamente, nas Figuras 13 e14. Nos gráficos da Figura 13, foram inseridos os dados de todas as medições de concentração de salinomicina feitas em triplicata de injeção em ordem aleatória. No gráfico de controle de médias para os lotes 1 e 2, foi observada uma tendência à diminuição da concentração de salinomicina no final das medições (sequência de pontos abaixo da linha central), chegando à existência de três pontos fora do limite inferior de controle (LIC), no caso do lote 1. Isso pode ter ocorrido devido a alguma instabilidade no sistema de medição LC-MS/MS. Nos gráficos de controle de amplitude, observou-se um ponto acima do limite superior de controle (LSC) para os lotes 1, 3 e 4.

Os gráficos da Figura 14 foram elaborados com as médias das concentrações de salinomicina por amostra (de tamanho 3, visto que foram feitas três injeções por amostra) como uma função do seu número de sequência de produção. Para todos os lotes não houve tendências, nem pontos fora dos limites de controle. Logo, os gráficos de controle também demonstraram que não houve tendência devida à preparação das amostras. Vale frisar que para definir um gráfico de controle, devem-se utilizar 25 amostras, podendo-se aceitar 15 amostras. No caso em questão, existem apenas 16 (lotes 1 e 2) e 10 (lotes 3, 4 e 5)

amostras; porém, não houve aqui intenção de obter limites de controle, mas apenas de verificar alguma tendência de comportamento dos pontos.

Essas duas maneiras de dispor os dados de concentração de salinomicina mostram que:

- por sequência aleatória de injeção, existe uma variabilidade no sistema LC-MS/MS;
- existe uma variabilidade entre as amostras dentro dos padrões aceitáveis.

Os resultados das análises de variância com fator único dos lotes estão representados na Tabela 8. Para todos os lotes, o teste F confirmou não haver diferenças significativas entre os resultados, pois apresentaram valores de $F_{calculado} < F_{crítico}$ (α= 5%), indicando que nenhum grau de heterogeneidade significativa foi detectado nos lotes. Isso demonstra que a variação da concentração de salinomicina na composição das amostras distribuídas nos recipientes foi suficientemente pequena para o objetivo proposto. Sendo assim, os resultados encontrados foram satisfatórios em relação à homogeneidade da amostra, indicando que os procedimentos realizados no preparo dos lotes: fortificação da amostra, tempo de homogeneização, liofilização, secagem por atomização, moagem, envase e fechamento a vácuo, foram adequados para a produção de um material de referência de matriz ovo contendo salinomicina.

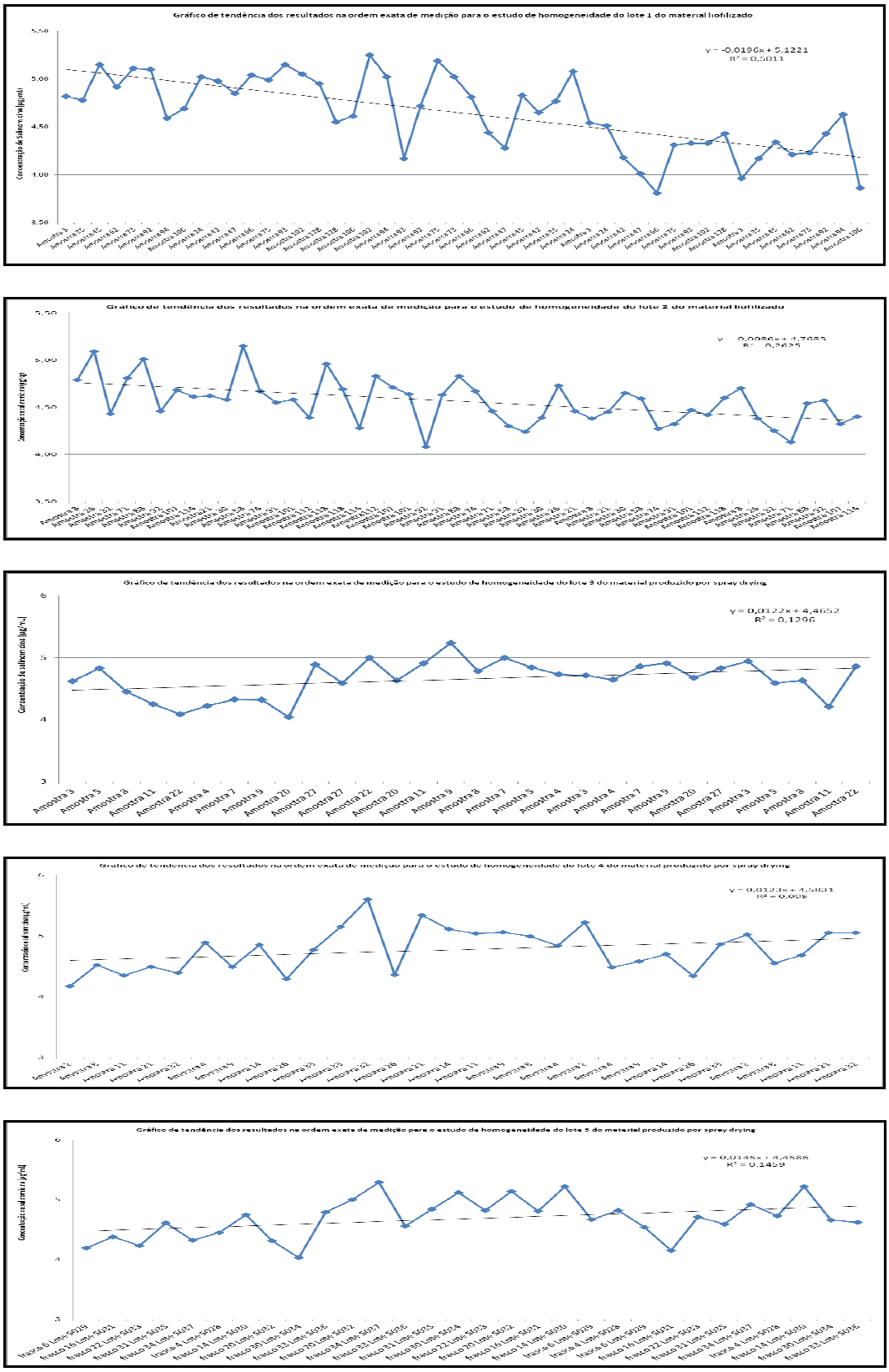


Figura 11. Gráficos de tendência dos resultados na ordem exata de medição para o estudo de homogeneidade dos lotes 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E).

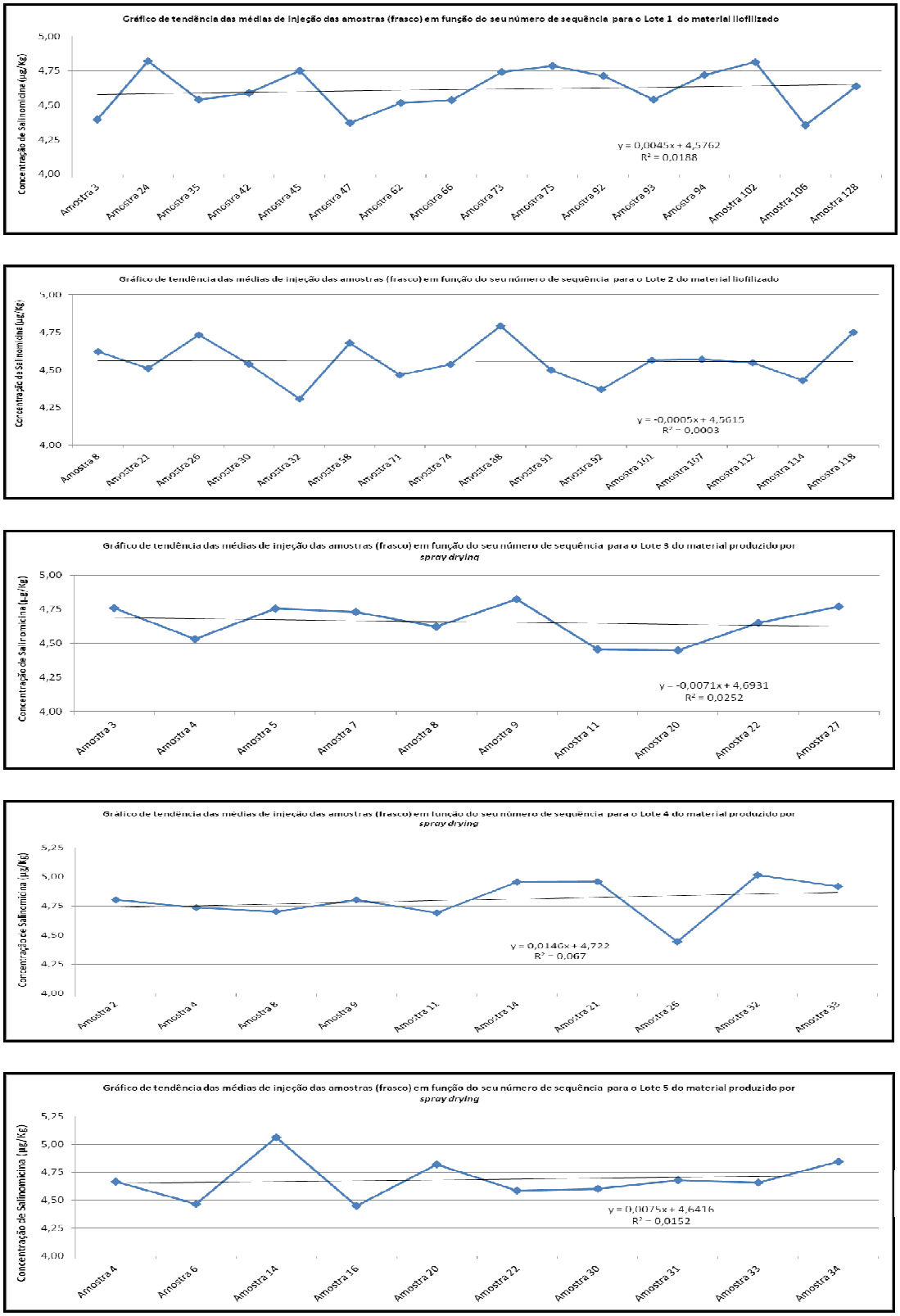


Figura 12. Gráficos de tendência dos resultados das médias das injeções das amostras (frascos) em função do número sequencial relacionado ao processo de produção dos lotes 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E).

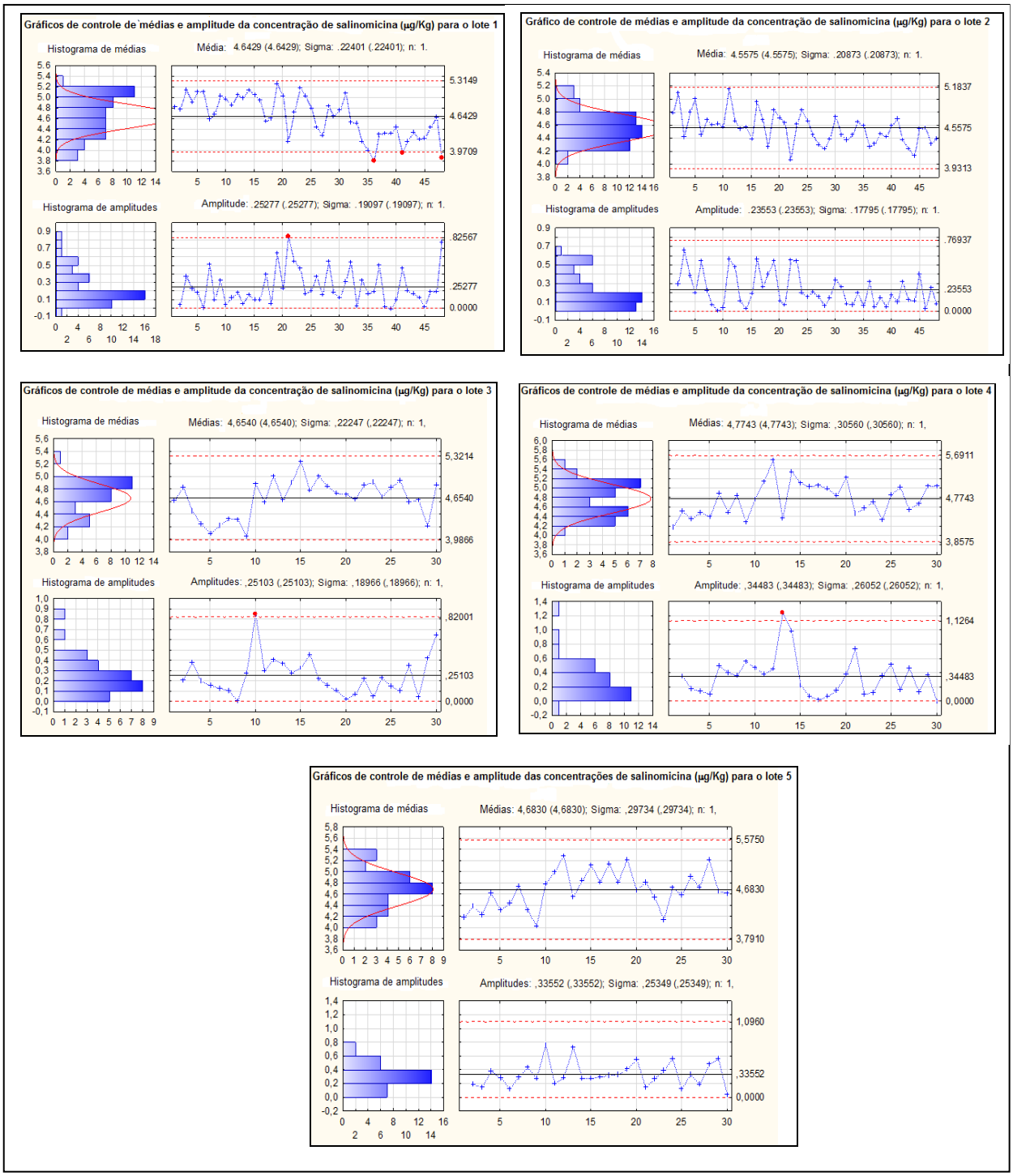


Figura 13. Gráficos de controle de médias e amplitudes das concentrações de salinomicina para avaliação de tendências devido a desvios nas medições de cada lote.

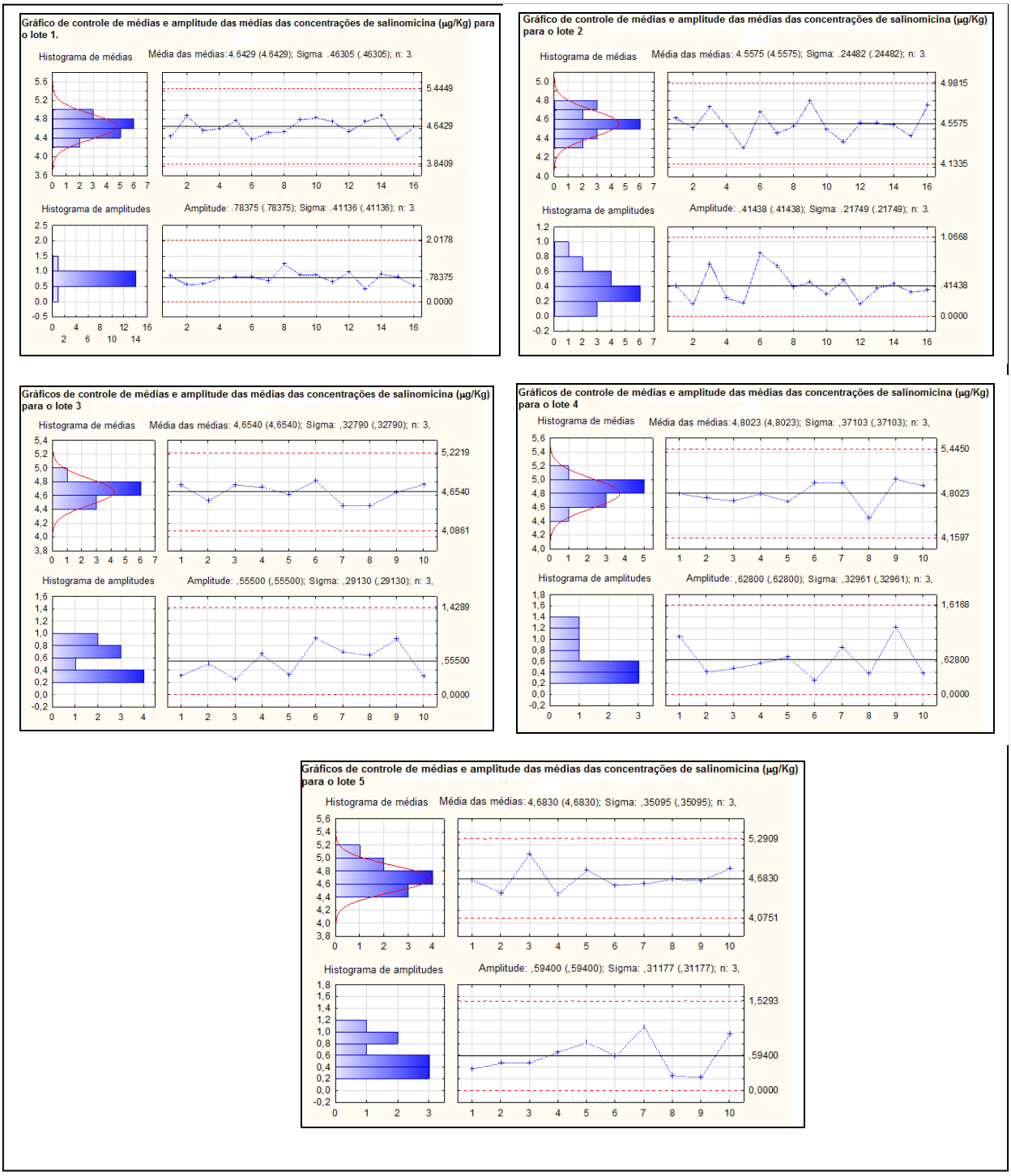


Figura 14. Gráficos de controle de médias e amplitudes das médias das concentrações de salinomicina para avaliação de tendências devido à preparação dos lotes.

Tabela 7. Valor-P das Análises de Variância para Regressão Linear das Medições e dos Lotes Produzidos

Lotes	**Valor-P para tendência nas medições**	**Valor-P para tendência no lote**
1 (liofilizado)	0,0000000183	0,612558
2 (liofilizado)	0,000197350	0,951246
3 (*spray drying* 150 ºC)	0,050645034	0,661236
4 (*spray drying* 120 ºC)	0,097463010	0,470098
5 (*spray drying* 180 ºC)	0,037278838	0,734071

Tabela 8. Análises de Variância de Fator Único do Estudo de Homogeneidade dos Lotes Produzidos

ANOVA – Lote 1

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	1,103507772	15	0,073567185	0,411649752	0,964628126	1,991989505
Dentro dos grupos	5,718817767	32	0,178713055			
Total	6,822325539	47				

ANOVA – Lote 2

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	0,816366667	15	0,054424444	0,975166424	0,500956068	1,991989505
Dentro dos grupos	1,785933333	32	0,055810417			
Total	2,6023	47				

ANOVA – Lote 3

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	0,496253333	9	0,055139259	0,531548129	0,834569921	2,392814108
Dentro dos grupos	2,074666667	20	0,103733333			
Total	2,57092	29				

ANOVA – Lote 4

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	0,78767	9	0,087518889	0,681010185	0,717268149	2,392814108
Dentro dos grupos	2,570266667	20	0,128513333			
Total	3,357936667	29				

ANOVA – Lote 5

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	0,92243	9	0,102492222	0,888763634	0,551675705	2,392814108
Dentro dos grupos	2,3064	20	0,11532			
Total	3,22883	29				

Uma contribuição para a incerteza global (U_{bb}) do material de referência inerente à homogeneidade, no entanto, foi obtida a partir dos resultados da ANOVA, e foi calculada em função dos valores da média quadrática (MQ) entre os frascos (MQ_{entre}) e dentro dos frascos (MQ_{dentro}). Foram obtidas incertezas entre 1,5 e 2,6%. Os valores calculados para estimar a contribuição da incerteza de uma possível heterogeneidade nos lotes estão na Tabela 9. Comparando-se os valores de U_{bb} encontrados para os lotes de MR-SAL em ovo produzidos neste trabalho, percebe-se que houve uma variação para os lotes produzidos por liofilização, 2,6% e 1,5%, respectivamente, para os lotes 1 e 2. O menor valor de U_{bb} para o lote 2, em relação ao lote 1, provavelmente é devido ao menor coeficiente de variação para as medições das concentrações de SAL, como pode ser observado no Apêndice E. Os valores de U_{bb} obtidos para os lotes produzidos por *spray drying* foram praticamente os mesmos, 2,2%, 2,4% e 2,3%, respectivamente, para os lotes 3, 4 e 5.

Tabela 9. Incertezas das Homogeneidades (U_{bb}) para os Lotes Produzidos.

Lotes	u_{bb}	$\% \, u_{bb}$
1	0,12203	2,6
2	0,06820	1,5
3	0,10457	2,2
4	0,11639	2,4
5	0,11025	2,3

4.8. Avaliação da Equivalência Entre os Lotes Produzidos por Liofilização

Foi realizado um estudo de Repetitividade e Reprodutibilidade (R&R) para os lotes 1 e 2 e pelos gráficos da Figura 15, observou-se que o lote 1 apresentou maior dispersão do que o lote 2. Isso deve ter ocorrido, provavelmente, devido a uma variabilidade no sistema de medição, visto que as medições foram realizadas em dias diferentes.

A Tabela 10 apresenta uma análise de repetitividade e reprodutibilidade para as amostras liofilizadas. Observa-se que 91,1% da variabilidade são devidas à repetitividade, ou seja, devidas às injeções, e apenas 0,755% devidas à variabilidade entre os lotes (reprodutibilidade). A variabilidade causada pelas amostras foi baixa: 8,13%, indicando que as mesmas são homogêneas. Concluímos então que a variabilidade da medida (R&R) é maior do que a do produto. Vale frisar que a variância do sistema está baixa e se algo tivesse de ser melhorado, seria o sistema de medição.

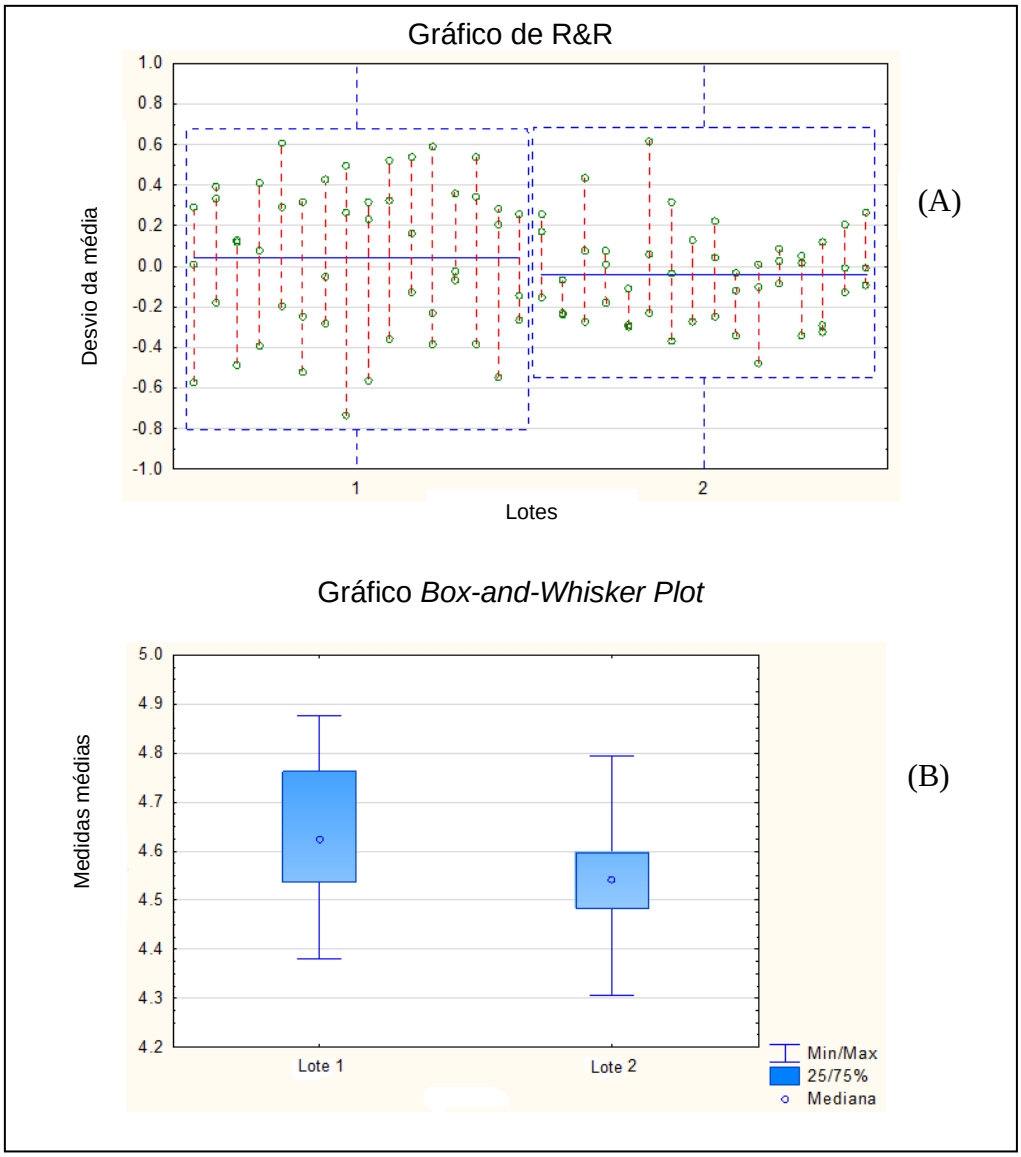


Figura 15. Gráficos de Repetitividade e Reprodutibilidade (A) e Box-Plot (B) das concentrações de salinomicina para os lotes 1 e 2.

Tabela 10. Análise de R&R para as Amostras Liofilizadas

Fonte (Sigma=R-bar/d2)	Média = 4,60 R-bar = 0,599 R(xbar) = 0,00854 R(amostras) = 0,382 Lotes: 2 Amostras: 16 Réplicas: 3			
	Sigma Estimado	Variância Estimada	% de R & R	% de Total
Repetitividade	0,354	0,125	99,2	91,1
Reprodutibilidade	0,0322	0,00104	0,822	0,755
Amostra-Amostra	0,106	0,0112		8,13
R & R Combinadas	0,355	0,126	100	91,9
Total	0,371	0,137		100

A Tabela 11 apresenta a análise de variância, mostrando claramente que não houve diferença estatisticamente significativa entre as variâncias dos lotes, das amostras e da interação entre eles.

Tabela 11. Tabela de ANOVA para as Amostras Liofilizadas

Fonte de Variância	Soma dos Quadrados	df	Média Quadrática	F	p
Lotes	0,175	1	0,175	2,20	0,158
Amostras	0,868	15	0,0579	0,729	0,726
Lotes × Amostras	1,191	15	0,0794	0,671	0,803
Medição (erro)	7,57	64	0,118		
Total	9,81	95			

A Figura 16 compara a concentração média de salinomicina entre os lotes 1 e 2 em relação a cada amostra. Embora a ANOVA não tenha acusado diferença estatisticamente significativa, pode-se observar que para algumas amostras existe uma diferença de tendência de comportamento. Por exemplo, a concentração diminui da amostra 1 para a amostra 2, no caso do lote 2, e aumenta no caso do lote 1. O mesmo acontece para outras amostras.

Pelo fato da análise ANOVA apresentar diferenças globais, o teste de Fisher (LSD) foi feito aqui para comparar todos os pares de médias. Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa apenas entre a amostra 5 do lote 2 e as amostras 2 e 14 do lote 1. Mas o que queremos comparar é diferença entre os lotes considerando as mesmas amostras.

O Teste *F* aplicado às médias das medições da concentração de salinomicina para os estudos de homogeneidade dos lotes 1 e 2, dos materiais liofilizados, indicou que as variâncias não são estatisticamente diferentes, pois o $F_{calculado} < F_{crítico}$, como pode ser observado na Tabela 12.

O Teste *t* para duas amostras, presumindo variâncias equivalentes, aplicado também às médias das medições da concentração de salinomicina para os estudos de homogeneidade dos lotes 1 e 2, dos materiais liofilizados, indicou que as médias são equivalentes entre os lotes. A Tabela com os resultados dessa avaliação encontra-se no Apêndice F. Portanto, considerando 5% de nível de significância, não houve diferença estatisticamente significativa entre os lotes 1 e 2 dos materiais de referência produzidos por liofilização.

Dessa forma, foi possível fazer apenas um único planejamento de estudos de estabilidade e de caracterização para ambos os lotes.

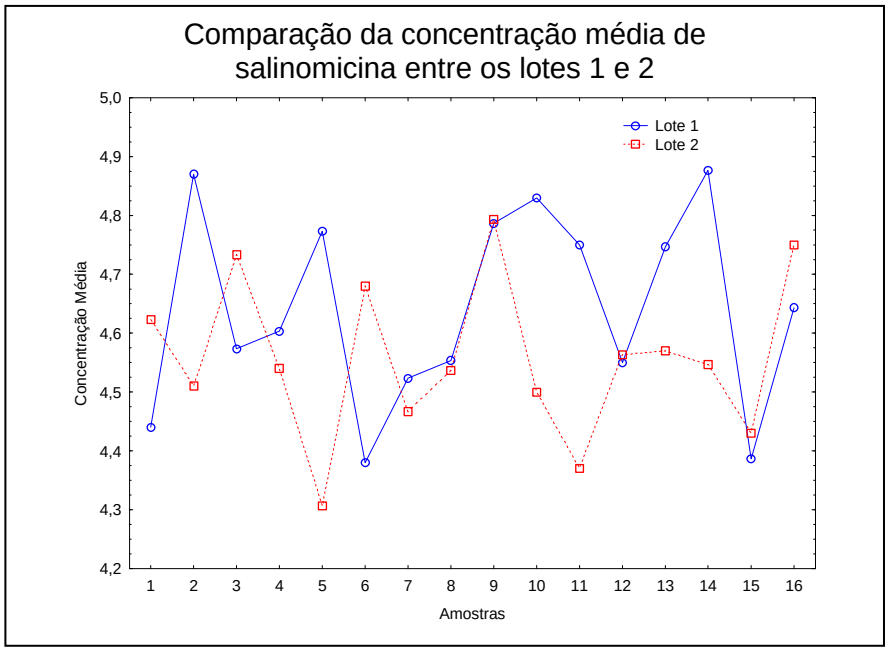


Figura 16. Gráfico de comparação da concentração média de salinomicina entre os lotes 1 e 2 em relação a cada amostra.

Tabela 12. Teste-F para Duas Amostras para Variâncias

	Lote 1	*Lote 2*
Média	4,614536	4,5575
Variância	0,024522	0,018141
Observações	16	16
Gl	15	15
F	1,351731	
P(F<=f) uni-caudal	0,283346	
F crítico uni-caudal	2,403447	

4.9. Avaliação de Alterações Significativas na Concentração de Salinomicina no Ovo pelos Processos de Liofilização e Desidratação por Atomização (*Spray Drying)*

Os resultados das análises de comparação das concentrações de salinomicina nas amostras fortificadas com 5 µg/Kg e dos lotes produzidos por liofilização e *spray drying* encontram-se no Apêndice G. A Tabela 13 mostra as médias de injeção para cada replicata de extração das concentrações de salinomicina encontradas nas amostras, assim como seus desvios-padrão, coeficiente de variação e os valores de recuperação. Os coeficientes de variação foram inferiores a 10 %, indicando a excelente qualidade dos pontos

experimentais. A princípio pode-se perceber uma queda na concentração de salinomicina nas amostras processadas em relação à amostra sem tratamento, sendo essa redução de 5,7 %, 7,5 %, 9,4 % e 7,5%, respectivamente, para a amostra liofilizada e para as desidratadas por *spray drying* a 150 ºC, 120 ºC e 180 ºC, conforme pode ser observado no gráfico da Figura 17. Entretanto, a análise de variância com fator único demonstrou que se pode aceitar a hipótese de igualdade entre as amostras, pois o valor-P > 0,05 e $F_{calculado} < F_{crítico}$, como pode ser observado na Tabela 14. Os testes *F* e *t* utilizados para a comparação dos resultados das amostras processadas com relação à amostra fortificada sem nenhum tratamento indicaram que não há diferenças significativas entre, respectivamente, os desvios-padrão e as médias das concentrações de salinomicina nas amostras testadas. As tabelas com os resultados dos testes *F* encontram-se, respectivamente, nos Apêndices H e I. Esses resultados demonstram que a aparente diminuição observada na concentração de salinomicina após os processamentos não têm significância estatística, e, portanto, o processamento de liofilização e desidratação por *spray drying* com diferentes temperaturas não alterou significativamente a concentração de salinomicina nas amostras para o nível de 5 µg/Kg.

Sinigoj-Gacnik e Zorman Rojs (2008) avaliaram o efeito do tratamento térmico de cozimento e fritura na concentração de SAL presente nos ovos, para entender melhor o comportamento dos resíduos de SAL nos ovos e estimar a exposição dos consumidores a esses resíduos, já que geralmente os alimentos de origem animal são cozidos antes do consumo. Os resultados mostraram que os ensaios de cozimento e fritura não tiveram influência sobre a concentração de SAL nos ovos, o que demonstra que essa substância é bastante estável em relação a altas temperaturas.

Tabela 13. Médias de Injeção para Cada Replicata de Extração das Concentrações de Salinomicina Encontradas nas Amostras

	Médias das concentrações de Salinomicina nas Amostras (µg/Kg)				
	Sem tratamento	**Liofilizada**	**Spray dryer 150ºC**	**Spray dryer 120ºC**	**Spray dryer 180ºC**
Replicata 1	5,7	5,0	5,0	5,0	4,8
Replicata 2	5,2	5,2	4,7	5,0	4,8
Replicata 3	4,9	4,8	5,0	4,5	5,0
Média global	**5,3**	**5,0**	**4,9**	**4,8**	**4,9**
Desvio padrão	0,35	0,22	0,17	0,27	0,14
Variância	0,13	0,051	0,028	0,072	0,019
Coef. Variação (%)	**6,8**	**4,5**	**3,4**	**5,6**	**2,9**
Recuperação (%)	**100**	**94,3**	**92,5**	**90,6**	**92,5**
Perdas (%)	**0**	**5,7**	**7,5**	**9,4**	**7,5**

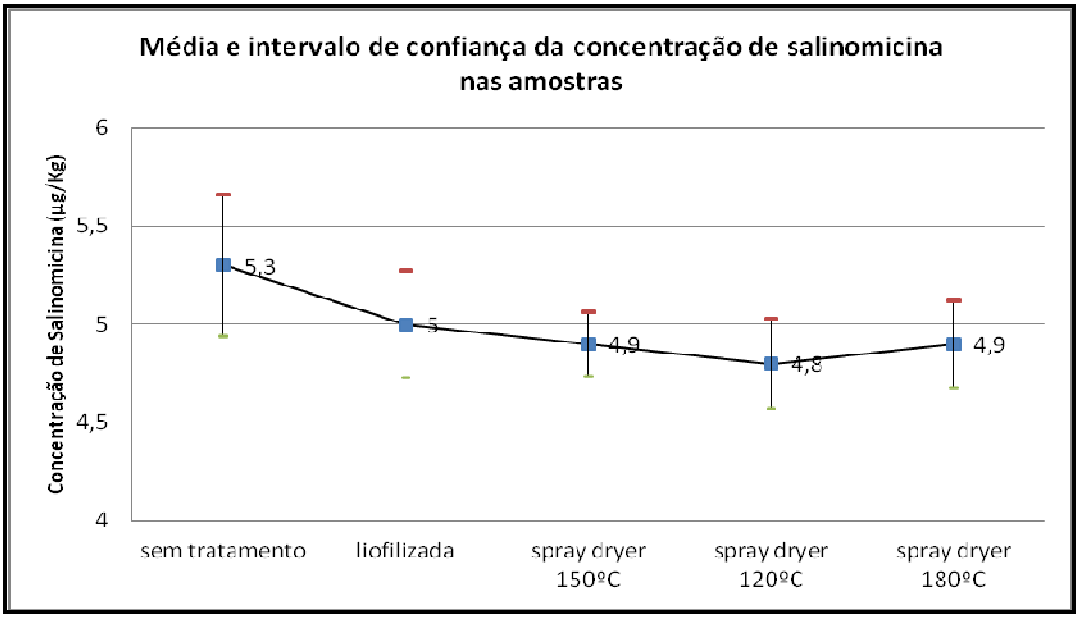


Figura 17. Média e intervalo de confiança dos resultados de concentração de 5 µg/Kg de salinomicina nas amostras.

Tabela 14. Análise de Variância com Fator Único da Concentração de Salinomicina nas Amostras Fortificadas a um Nível de 5 µg/Kg e Processadas por Liofilização e *Spray Drying*

Fonte da variação	***SQ***	***Gl***	***MQ***	***F***	***valor-P***	***F crítico***
Entre grupos	0,36257037	4	0,090642593	1,524410753	0,26771971	3,478049691
Dentro dos grupos	0,594607407	10	0,059460741			
Total	0,957177778	14				

4.10. Estudo de Estabilidade de Curta Duração

As médias das medições para as concentrações de salinomicina para os estudos de estabilidade de curta duração para as três temperaturas testadas encontram-se no Apêndice J.

Os gráficos de tendência das amostras de cada lote avaliadas para as temperaturas de 50 ºC, 25 ºC e -20 ºC estão ilustrados, respectivamente, nas Figuras 18, 19 e 20. As Tabelas 15, 16 e 17 mostram os valores da inclinação, dos erros-padrão da inclinação e os valores-P extraídos da análise de regressão, assim como os fatores *t* de *Student* e o produto da multiplicação do $t_{(0,95;\ n-2)}$ x $s(b_1)$, obtidos da análise de regressão dos lotes produzidos e

avaliados, respectivamente, para as temperaturas de 50 ºC, 25 ºC e -20 ºC. Os dados completos da análise de regressão estão no Apêndice K. Pode-se observar que as inclinações e as regressões foram insignificantes em todas as temperaturas avaliadas para todos os lotes produzidos. Consequentemente, não houve instabilidade da salinomicina nas condições testadas. Porém, para a matriz, foi observada uma mudança na coloração das amostras mantidas na temperatura de 50 ºC, como pode visto na Figura 21, provavelmente, devido à reação de Maillard e à oxidação de lipídeos da amostra. A avaliação da oxidação lipídica das amostras de MR-SAL liofilizadas, utilizadas neste estudo de estabilidade, está descrita a seguir no item 4.10. Isso demonstra que houve uma instabilidade na composição da matriz a esta temperatura, o que indica que, embora a salinomicina tenha se mantido estável em todas as condições testadas, esses materiais de referência deverão ser transportados em temperaturas menores (25 ºC a -20 ºC), com a finalidade de preservar a integridade da matriz. Devido a esse fato, não se utilizou a temperatura de 50 ºC no estudo de estabilidade das amostras de MR-SAL produzidas por *spray drying*.

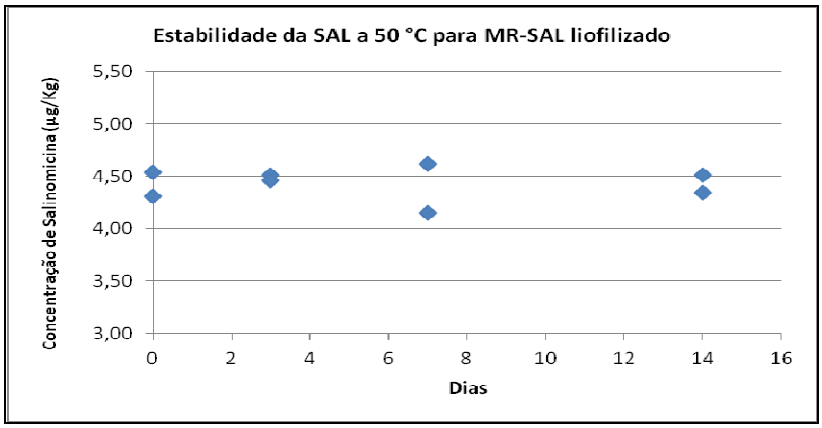


Figura 18. Gráfico de tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade dos MR-SAL, produzidos por liofilização, lotes 1e 2, a 50 ºC durante 14 dias.

Tabela 15. Dados Obtidos da Análise de Regressão e Avaliação da Inclinação do Estudo de Estabilidade de Curta Duração a 50°C para o MR-SAL Produzido por Liofilização

Parâmetros	***Lote 1***
Inclinação ($\|b_1\|$)	0,00159
Erro padrão $s(b_1)$	0,010932
Valor-p (>0,05)	**0,889361**
$t_{(0,95;\ n-2)}$	2,4469118
$\mathbf{t_{(0,95;\ n-2)} \times s(b_1) > \|b_1\|}$	**0,0267496**

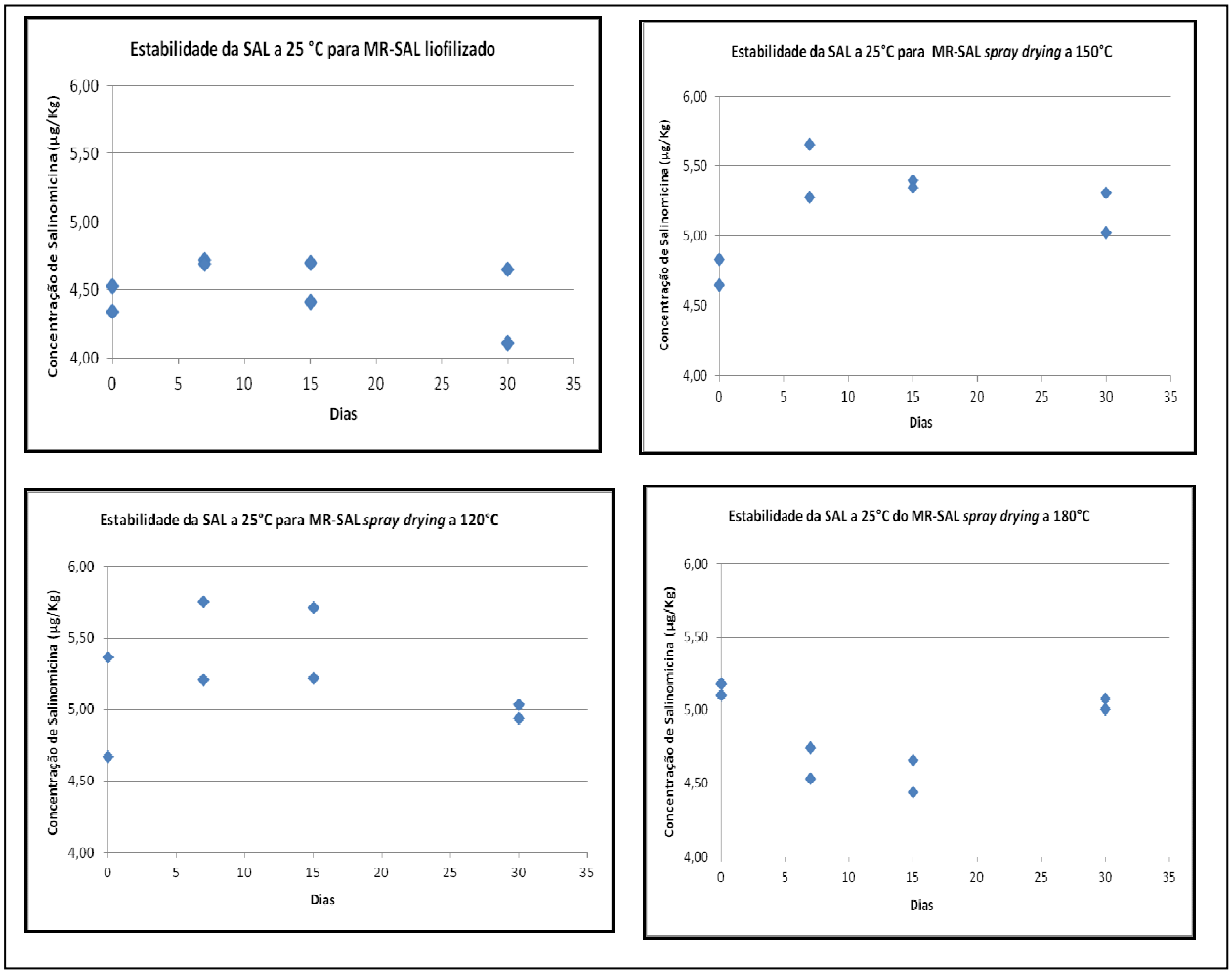


Figura 19. Gráficos de tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade dos MR-SAL a 25 ºC durante 30 dias.

Tabela 16. Dados Obtidos da Análise de Regressão e Avaliação da Inclinação do Estudo de Estabilidade de Curta Duração a 25°C para os Lotes de MR-SAL Produzidos

Parâmetros	***Lote 2 (liofilizado)***	***Lote 3 (spray drying a 150°C)***	***Lote 4 (spray drying a 120°C)***	***Lote 5 (spray drying a 180°C)***
Inclinação ($\|b_1\|$)	0,00458	0,008437	0,004953	0,000258
Erro-padrão $s(b_1)$	0,00723	0,010716	0,012569	0,009782
Valor-p (>0,05)	**0,54966**	**0,461030**	**0,707140**	**0,979838**
$t_{(0,95;\ n-2)}$	2,4469118	2,4469118	2,4469118	2,4469118
$\mathbf{t_{(0,95;\ n-2)} \times s(b_1) > \|b_1\|}$	**0,0176911**	**0,0262201**	**0,0307542**	**0,0239365**

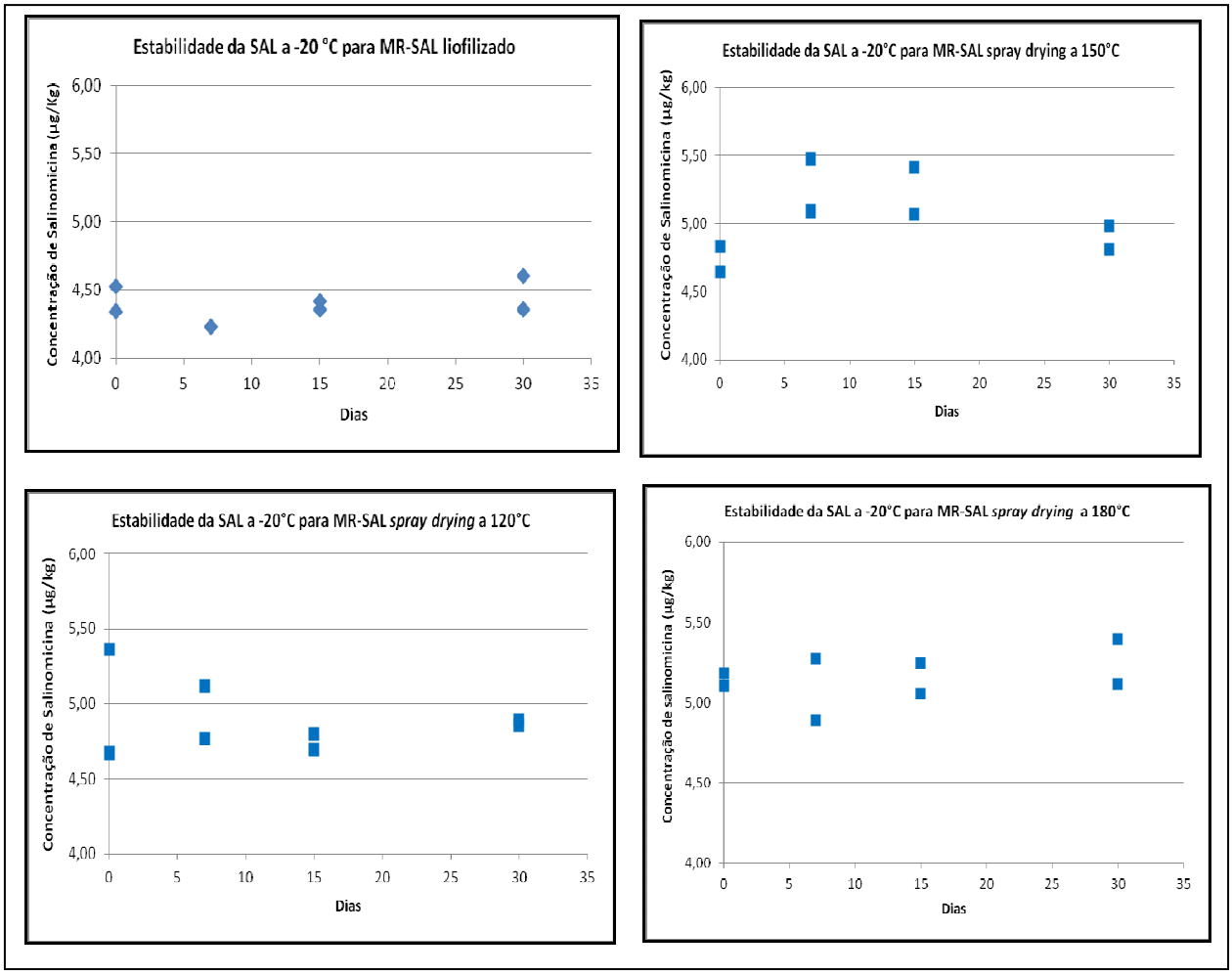


Figura 20. Gráficos de tendência das medições em função do tempo para o estudo de estabilidade dos MR-SAL a -20 ºC durante 30 dias.

Tabela 17. Dados Obtidos da Análise de Regressão e Avaliação da Inclinação do Estudo de Estabilidade de Curta Duração a -20°C para os Lotes de MR-SAL Produzidos

Parâmetros	***Lote 2 (liofilizado)***	***Lote 3 (spray drying a 150°C)***	***Lote 4 (spray drying a 120°C)***	***Lote 5 (spray drying a 180°C)***
Inclinação ($\|b_1\|$)	0,003969	0,000967	0,005164	0,004582
Erro-padrão $s(b_1)$	0,004204	0,009897	0,007796	0,004927
Valor-p (>0,05)	**0,381593**	**0,925333**	**0,532348**	**0,388294**
$t_{(0,95;\ n-2)}$	2,4469118	2,4469118	2,4469118	2,4469118
$t_{(0,95;\ n-2)} \times s(b_1) > \|b_1\|$	**0,0102868**	**0,0242174**	**0,0190772**	**0,0120557**

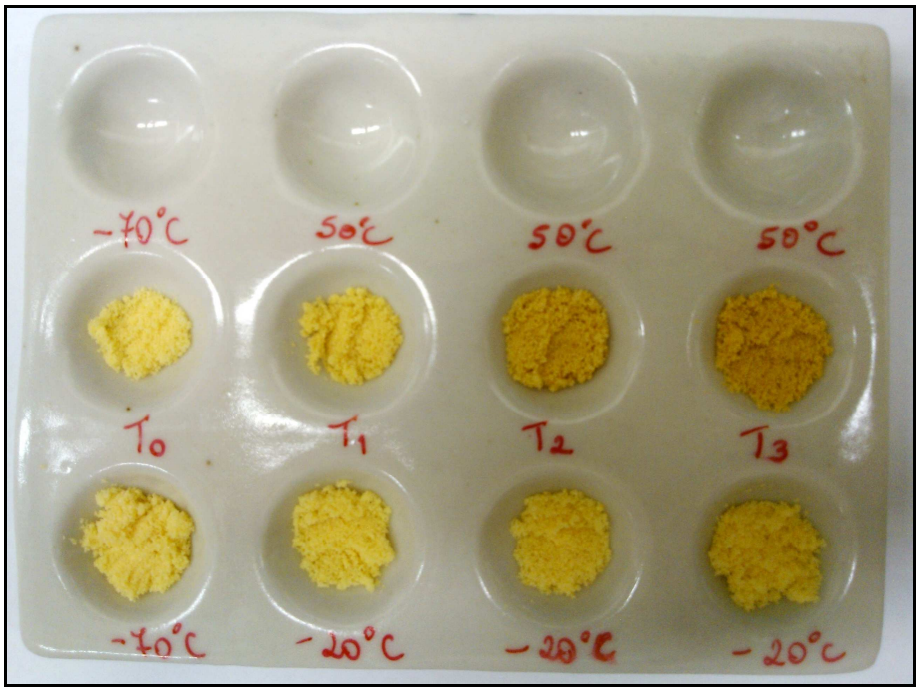


Figura 21. Alteração da coloração da amostra com o tempo de armazenamento a 50ºC em comparação com as amostras armazenadas a -20ºC para o lote 1.

De acordo com a norma ISO Guia 35, na ausência de um modelo cinético bem definido de degradação para o candidato a material de referência, o modelo básico para um estudo de estabilidade é o linear. Entretanto, a reta relacionando a concentração e o tempo pode não ser o modelo adequado, implicando na não significância estatística do coeficiente angular e em baixo valor do coeficiente de determinação (R^2). Porém, isso não indica que não haja uma relação entre a concentração e o tempo, visto que outros modelos existem, como por exemplo, o parabólico, o exponencial, o logarítmico, etc. Os gráficos da Figura 22 mostram que as variações da concentração de salinomicina em função do tempo, para as temperaturas testadas no estudo de estabilidade dos lotes produzidos pela desidratação por *spray drying,* podem ser descritas por outro modelo, que não o linear. Porém, para a definição do modelo mais adequado, seria necessário um estudo de estabilidade empregando-se mais pontos relacionando a concentração com o tempo de exposição à determinada temperatura, o que exigiria um maior número de amostras e de experimentos. Dessa forma, as médias da concentração de salinomicina obtidas em duplicata para cada tempo de exposição, em cada temperatura estudada, foram avaliadas também pela análise de variância (ANOVA) de fator único e o teste LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher, além da regressão linear.

A ANOVA de fator único confirmou a estabilidade da salinomicina por 30 dias nas temperaturas de -20ºC e 25ºC, pois não houve diferenças estatisticamente significativas nas

variâncias para todos os lotes, com exceção do lote 5 na temperatura de 25 ºC. O valor-P encontrado de cada lote para cada temperatura estudada encontra-se na Tabela 18. As planilhas com os resultados dos testes LDS de Fisher calculados pelo software Statistica® 8.0 estão ilustradas no Apêndice L. O resultado da avaliação pelo teste LSD de Fisher confirmou que, estatisticamente, houve diferenças significativas para os pares de médias das concentrações de SAL para o lote 5 na temperatura de 25 ºC. Sendo assim, o resultado da ANOVA para o lote 5 na temperatura de exposição de 25 ºC contradiz os resultados da estabilidade do analito avaliados pela regressão linear. Essa diferença estatisticamente significativa para as variâncias do lote 5, exposto a 25 ºC, pode ser devida a alguma instabilidade no sistema de medição. Dessa forma, por precaução, no caso de se produzir materiais de referência por *spray drying,* com temperatura de secagem de 180 ºC, o estudo de estabilidade de curta duração para exposição à temperatura de 25 ºC deverá ser refeito.

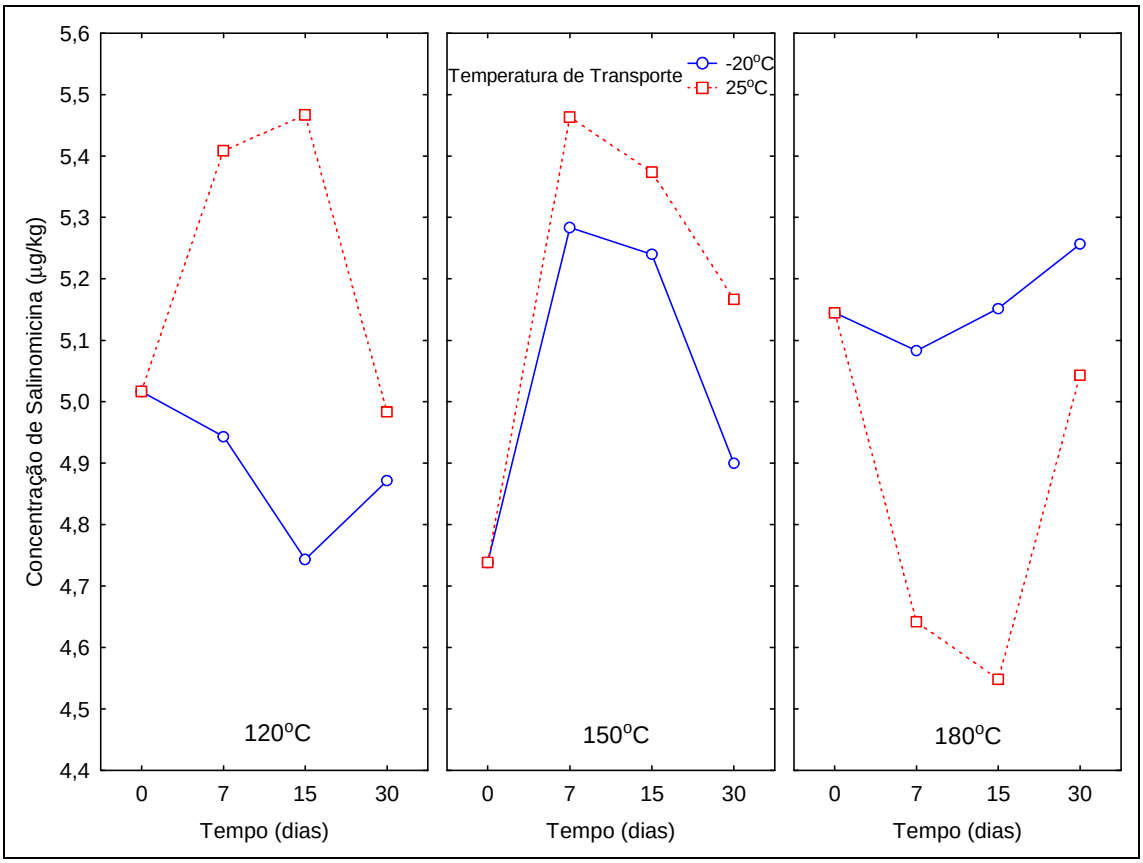


Figura 22. Gráficos das variações da concentração de salinomicina em função do tempo, nas temperaturas de 25 ºC e -20 ºC, para os lotes 3 (temperatura de secagem = 150 ºC), 4 (temperatura de secagem = 120 ºC) e 5 (temperatura de secagem = 180 ºC) produzidos pela desidratação por *spray drying*.

Tabela 18. Valor-P das Análises de Variância de Fator Único para o Estudo de Estabilidade de Cada Lote

Lotes	Temperaturas de estudo (°C)	Valor-P para tendência no lote
1 (liofilizado)	- 20	0,263660
	25	0,958517
	50	0,958517
3 (*spray drying* 150 ºC)	- 20	0,136300
	25	0,053190
4 (*spray drying* 120 ºC)	- 20	0,791470
	25	0,425197
5 (*spray drying* 180 ºC)	- 20	0,820591
	25	0,014156

4.11. Avaliação da Oxidação Lipídica das Amostras de MR-SAL Liofilizadas Utilizadas no Estudo de Estabilidade de Curta Duração

Os resultados das medições da avaliação do grau de oxidação lipídica estão na Tabela 19. O gráfico ilustrado na Figura 23 mostra que houve um aumento no número de TBA nas amostras armazenadas à temperatura de 50 ºC com apenas sete dias, e esse valor se manteve estável por até 15 dias. Para as amostras armazenadas a 25 ºC e -20 ºC não foram observadas grandes variações quanto ao índice de TBA. Portanto, pode-se dizer que a temperatura de 50 ºC realmente favorece a oxidação lipídica na matriz. Dessa forma, para que se tenha a preservação da matriz, é necessário que o material de referência seja transportado em temperaturas entre 25 ºC e -20 ºC.

Tabela 19. Resultados das Análises de Oxidação Lipídica das Amostras de MR-SAL Liofilizadas Utilizadas no Estudo de Estabilidade de Curta Duração

	Nº de TBA		
tempo	**25ºC**	**(-20ºC)**	**50ºC**
0	0,24	0,24	0,24
7	0,28	0,31	0,5
15	0,27	0,25	0,49
30	0,3	0,28	------

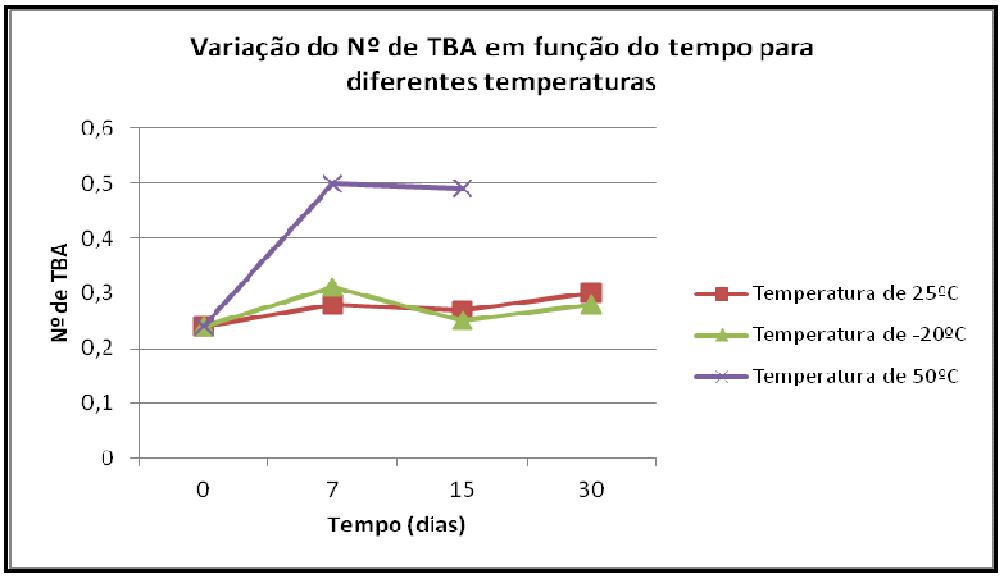


Figura 23. Gráfico ilustrando a variação do Nº de TBA em função do tempo para as diferentes temperaturas testadas das amostras do lote 1 para 50 ºC e lote 2 para 25 ºC e -20 ºC.

4.12. Planejamento do Estudo de Estabilidade de Longa Duração

Sabe-se que os produtos de ovos integrais desidratados industrializados possuem um prazo de validade de um ano quando armazenados a temperatura ambiente. A salinomicina a uma concentração de 1000 µg/kg em metanol se mantém estável por 2 anos e 5 meses se armazenada a temperatura igual ou inferior a -70 ºC (PEREIRA, 2013). Portanto, assumiu-se que o MR deva ser definitivamente estável a temperatura de referência de -70 ºC e estabeleceram-se os períodos de 12 e 24 meses para o estudo de estabilidade de longa duração para o MR.

As condições de investigação estabelecidas para o estudo de estabilidade de longa duração serão de armazenamento em temperaturas de congelamento, refrigeração e a temperatura ambiente, ou seja, aproximadamente -20 ºC, 4 ºC e 25 ºC, respectivamente.

Um material de controle de qualidade (MCQ) de antibióticos da classe das quinolonas em matriz ovo, produzido por liofilização, também foi avaliado nestas condições de temperaturas, tendo como temperatura de referência -80 ºC. A estabilidade deste material foi estudada por 12 meses seguindo as duas estratégias, um modelo clássico e um modelo isócrono. No método clássico, amostras individuais armazenadas em cada uma das quatro temperaturas estudadas foram analisadas mensalmente em triplicata. Para o método isócrono, três das amostras armazenadas inicialmente a -80 ºC foram retiradas mensalmente da temperatura de referência e armazenadas nas outras três temperaturas de

investigação. Neste último caso, as amostras foram analisadas em triplicata, após 12 meses, ao fim do estudo. As amostras correspondentes à mesma temperatura de armazenamento foram analisadas no mesmo dia, com uma amostra que tinha permanecido à temperatura de referência para a totalidade do período. Três dias foram necessários para realizar todas as análises. Pelos dois modelos estudados, o MCQ foi considerado estável por um ano para as três temperaturas estudadas, porém para a abordagem isócrona com menor variação nos resultados (JIMÉNEZ; COMPANYÓ; GUITERAS, 2012).

Um outro MCQ de narasina, um anticoccidiano ionóforo poliéter, e nicarbazina em ovo, produzido também por liofilização, foi avaliado por Olejnik et al (2013). O estudo de estabilidade de longa duração foi realizado somente na condição de armazenamento a -20 ºC durante 12 meses. As amostras de referência foram armazenadas abaixo de -70 ºC. Também foi utilizado o modelo isócrono para este estudo. O MCQ foi considerado estável por um ano para ambos os analitos.

O modelo isócrono vem sendo implementado como prática no IRMM para estudos de estabilidade e monitoramento de estabilidade pós-certificação (LINSINGER et al, 2004).

4.13. Caracterização do Candidato à Material de Referência

Como resultados da pesquisa de metodologias para a determinação de salinomicina em ovos foram encontradas 12 publicações, a da metodologia desenvolvida por Spisso et al (2010a), utilizada neste trabalho, e 11 de instituições e laboratórios internacionais. Todos utilizam a técnica de LC-MS/MS. Uma tabela com as informações das metodologias pesquisadas é apresentada no Apêndice M.

Dessa forma, como proposta de continuação do tema abordado nesta dissertação, os laboratórios identificados na pesquisa serão convidados a participar da caracterização de um novo lote de MR preparado em maior escala.

Assim, espera-se que o novo material preparado, tendo homogeneidade e estabilidade confirmadas, seja caracterizado pela comparação dos resultados pelo menos dois ou três laboratórios participantes, conforme recomendação da ISO Guia 35.

4.14. Considerações finais

As avaliações realizadas neste trabalho demonstraram que a liofilização e a secagem por *spray drying* são adequadas para desidratar a matriz e assegurar a

estabilidade do material. Porém, algumas vantagens e desvantagens para os diferentes processamentos foram observadas.

Os lotes produzidos por liofilização apresentaram excelentes rendimentos, indicando que a perda de amostra devido ao processamento é mínima. Porém, este processamento é mais demorado em relação à secagem por *spray drying*, pois foram necessárias 40h para a secagem da amostra na liofilização de cada lote, enquanto que para secagem por *spray drying* foram produzidos 3 lotes em apenas aproximadamente 5 horas. Devido à necessidade da etapa de moagem e homogeneização do pó obtido, o processamento por liofilização também demonstrou ser mais trabalhoso.

A desidratação por *spray drying* tem a vantagem de ser um processo bem mais rápido para a secagem da amostra do que a liofilização. Além disso, o produto já é obtido na forma de pó, não havendo necessidade da etapa de moagem. Porém as perdas de amostra durante o processamento conferem a desvantagem de se obter um rendimento mais baixo do que no processamento por liofilização.

De acordo com o levantamento bibliográfico dos métodos de análise utilizados para a determinação de anticoccidianos em ovos apresentado no Apêndice L, a quantidade de amostra utilizada em cada análise varia de 2 a 10 g de ovo integral homogeneizado em seu estado natural. Sendo assim, para atender a esses laboratórios, deve-se embalar uma quantidade maior do material por frasco. Portanto, levando-se em consideração a massa de ovo integral desidratado equivalente ao ovo integral homogeneizado na sua forma original, tem-se que 2,5 g do ovo desidratado equivalem a 10 g de ovo na sua forma original. Considerando-se que as pequenas perdas de amostra que ficam retidas na embalagem e na tampa, estabeleceu-se que a quantidade mínima de amostra fornecida em cada frasco deve ser de 3 g.

Ambos os testes foram realizados em equipamentos de laboratório de baixa capacidade de produção. O uso de equipamentos de escala semi-industrial seria mais adequado para a produção de MR, pois dessa forma, uma quantidade maior de produto seria obtida em menor tempo. No caso da desidratação por *spray drying*, como há perdas consideráveis durante o processamento da amostra, o uso de um equipamento de maior capacidade de produção pode apresentar rendimentos diferentes do encontrado.

5. CONCLUSÃO

Tanto o processamento por liofilização como o de secagem por *spray drying* se mostraram viáveis para a produção de materiais de referência de salinomicina em matriz ovo.

Os estudos de homogeneidade demonstraram que os procedimentos e condições de preparação e embalagem dos materiais foram satisfatórios, uma vez que todos os lotes se apresentaram homogêneos.

Pelos estudos de estabilidade de curta duração verificou-se que, para a preservação da integridade da matriz, o material deve ser transportado livre de calor, sendo mantido na faixa de temperatura de 25ºC a -20ºC.

Os resultados obtidos até o momento subsidiam a viabilidade da produção do material de referência de salinomicina em matriz ovo, que poderá se tornar um material de referência candidato à certificação.

Fundamentando-se pelas informações de estabilidade do analito encontradas na literatura, e do ovo em pó, espera-se que o material seja estável nas condições de tempo e temperatura estabelecidas no planejamento do estudo de estabilidade de longa duração.

Os materiais produzidos neste estudo poderão ser futuramente utilizados como materiais de controle de qualidade, sendo uma ferramenta útil para os laboratórios de análise de resíduos medicamentos veterinários em alimentos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar a estabilidade de longa duração do material produzido neste estudo e estabelecer as condições de armazenamento do mesmo.

Convidar os laboratórios e instituições que realizam a análise de determinação de salinomicina em ovos para participar da caracterização do material. Enviar as amostras obtidas neste trabalho para uma prévia avaliação e ajuste da metodologia.

Produzir um novo material de referência no nível do Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória para salinomicina em ovo, 10 µg/Kg, estabelecido pelo MAPA.

Com homogeneidade e estabilidade confirmadas, caracterizar o material de referência produzido pela comparação dos resultados de dois ou três laboratórios participantes, conforme recomendação da ISO Guia 35.

7. REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - ISO/IEC 17025:2005 (2006): Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

_____. Associação Brasileira De Normas Técnicas - ISO Guia 35 (2012): Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

_____. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ISO Guia 31 (2004): Conteúdo de certificados de materiais de referência.

_____. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ISO Guia 34 (2004): Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência.

ALBERTON, L. R.; PACHALY, J. R.; BELLETINI, S. T.; GIOVANELLI, D. F. Intoxicação por salinomicina em equinos – estudo de um surto em 39 animais. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 29-32, 2011.

ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. 3ª Ed. Viçosa: UFV, 2006.

AZEREDO, H. M. C.; Fundamentos de estabilidade de Alimentos. 2ª edição revista e ampliada. Editora técnica, Brasília, DF, Embrapa, 2012.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Química do Processamento de Alimentos. 2 ed. São Paulo: Varela, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 07 de 04 de abril de 2012. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Aminal referentes ao exercício do ano de 2011. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2007-2012.pdf>. Acesso em: 26 fev 2014.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 07 de 27 de março de 2013. Promove a publicação dos resultados do PNCRC/Aminal referentes ao exercício do ano de 2012. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2007-2013.pdf>. Acesso em: 26 fev 2014.

_____. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas autorizados (atualização 03/12/2008). Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados. Acesso em: 01 mar 2014.

_____. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. Normas gerais de inspeção de ovos e derivados. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 11 mar 2014.

BSI – British Standards Institution. **BS 5309-1**. Métodos para Amostragem de Produtos Químicos – Parte 1: Introdução e princípios gerais. Reino Unido, 1976. 36p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COMAR. International database for certified reference materials. <http://www.comar.bam.de/home/search_crm.php>. Acesso em: 11 mar 2014.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission 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. Off J Eur Commun. 2009. L40:7-11.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. Química Nova na Escola. Nº 7, maio, 1998.

DORNE, J.L.C.M.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; BERTELSEN, U.; RENSHAW; D. W.; PELTONEM, 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, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 270, p.196–280, 2013.

DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Fourth edition. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

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

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. **Journal of Chromatography A, 1216**, p.8149–8157, 2009.

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

EPTIS. Disponível em: <http://www.eptis.bam.de/php/eptis/index_results1.php>. Acesso em: 01 mar 2014.

FERREIRA, D. J.; PEREIRA, A. R.; ALLGAYER, M.; RODRIGUES, L. B. A Coccidiose na Avicultura. Revista Sanidade Avícola. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.php?codigo=23>. Acesso em: 27 abr 2014.

FERREIRA, R. G.; SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P. Anticoccidianos Ionóforos Poliéteres em Ovos: Metodologias Analíticas e Ocorrência no Brasil. In: XVIII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos - ENAAL 2013, São Paulo. **Anais eletrônicos...**São Paulo: CCR, 2013.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2002.

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. **Analytica Chimica Acta,** 700, p.167–176, 2011.

GARCIA, Laura P. **Liofilização aplicada a alimentos** [trabalho acadêmico de curso de graduação]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2009.

GAVA, Altanir J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1981.

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. **J. Agric. Food Chem.,** 52, p.6848–6856, 2004.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª edição. 1ª edição digital.São Paulo:Instituto Adolfo Lutz, 2008.Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20&func=fileinfo&id=5>. Acesso em: 22 fev 2014.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia – Orientação para a Seleção e Uso de Materiais de Referência – DOQ-CGCRE-016, Revisão 02 – 02/2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-16_02.pdf>. Acesso em: 01 mar 2014.

JIMÉNEZ, V.; COMPANYÓ, R.; GUITERAS, J. Analysis of quinolones antibiotics in eggs: preparation and characterization of a raw material for method validation and quality control. **Food Chemistry,** 134, p.1682-1690, 2012.

KENNEDY, D.G., HUGHES, P.J., BLANCHFLOWER, W.J., 1998. Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. **Food Addit. Contam.** 15 (5), p. 535–541, 1998.

KOÇ, M.; KOÇ, B.; GÜNGÖR, O.; ERTEKIN, F. K.; The effects of moisture on physical properties of spray-dried egg powder. **Drying Technology,** 30 (6), p. 567–573, 2012.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius J Anal Chem,** 360, p.359–361, 1998.

LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; VAN DER VEEN, A. M. H.; et al.; Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance,** v. 6, p.20 – 25, 2001.

LINSINGER, T. P. J. Planning and combining of isochronous stability studies of CRMs. **Accred Qual Assur,** 9, p.464-472, 2004.

MAIA, E. L. **Composição, conservação e utilização do curimbatá, Prochilodus scrofa, Steindachner, 1881**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1980.

MARTÍNEZ-VILLALBA, A.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** 23, p.1255-1263, 2009.

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

MATABUDUL, D.; LUMLEY, POINTS, J. S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analyst,** 127, p. 760 – 768, 2002.

MAZUCCO, H. Resíduos contaminantes em ovos comerciais. Avicultura Industrial; 2006; 1:12-20.

MIAO, X.; MARCH, R. E.; METCALFE, C. D. Fragmentation study of salinomycin and monensin A antibiotics using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v.17, n.2, p.149-154, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 01 mar 2014.

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,** 1253, p. 94–104, 2012.

MORTIER, L. DAESELEIRE, E.; PETEGHEM, C. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.,**19, p. 533-539, 2005.

NETTO, J. V. P. Antibióticos e Quimioterápicos em Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.

NIST. National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <https://www-s.nist.gov/srmors/detail.cfm>. Acesso em: 11 mar 2014.

NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; VARGAS, P. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. Pesq. Vet. Bras. 29(3): 191-197, 2009.

OLEJNIK, M.; JEDZINIAK, P.; SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ, T.; ZMUDZKI, J. In-house quality control material of nicarbazin and anarsin in eggs: preparation and inter-laboratory evaluation. **Accred Qual Assur,** 18, p.421-427, 2013.

ORDÓÑEZ, Juan A. **Tecnologia de Alimentos:** Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005 (a).

_____. **Tecnologia de Alimentos:** Componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2005 (b). 294p.

PEREIRA, M. U. **Determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por LC-MS/MS.** 2013. 149f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova,** vol. 36, nº 5, p.697–710, 2013.

PROGETTO TRIESTE. Veterinary Drug Residue – Programme 2014. Disponível em: <http://www.testveritas.com/wp-content/uploads/2013/11/programma-2014-EN3.pdf>. Acesso em: 01 mar 2014a.

PROGETTO TRIESTE. Control Material Certificate – MO 01 PRO. Disponível em: <http://www.testveritas.com/wp-content/uploads/2011/10/E1225-2.pdf>. Acesso em: 13 mar 2014b.

ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. **Food Additives and Contaminants,** 23 (5), p.470 – 478, 2006.

ROSA, E. D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L. A. P. Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações. Disponível em: <http://www.fazu.br/hd2/jornada2006/PALESTRAS/ENGE/palestra2.pdf>. Acesso em: 06 mar 2013.

ROSEN, J. Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotiiver and eggs by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analyst,** 126, p. 1990 – 1995, 2001.

ROSENTHAL, A. Tecnologia de Alimentos e Inovação: Tendências e Perspectivas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2008.

SHAO, B.; WU, X.; ZHANG, J.; DUAN, H.; CHU, X.; WU, Y. Development of rapid LC-MS-MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. **Chromatographia**, v. 69, n.9/10, p. 1083-1088, 2009.

SINIGOJ-GACNIK, K.; ZORMAN ROJS, O. Salinomycin concentration in eggs and tissues of laying hens. **Acta. Vet. Brno.,** 77, p.423-429, 2008.

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

SPISSO, B.F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. A.; COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; 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,** n.682, p.82–92, 2010a.

SPISSO, B.F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; MONTEIRO, M. A.; COSTA, R. P.; CRUZ, T. A.; NÓBREGA, A. W. Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues. **Food Addtives and Contaminants: Part B,** 3:4, p.212–219, 2010b.

STORY, P.; DOUBE, A. A case of human poisoning by salinomycin na agricultural antibiotic. **Journal of the New Zealand Medical Association**, 117:190, 2004. Disponível em: https://www.nzma.org.nz/journal/117-1190/799/. Acesso em: 05 mai 2014.

TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ª edição. Campinas: NEPA/Unicamp, 2011. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 26 fev 2014.

TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNATHAN, M. T. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 37, p. 44-48, 1960.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF. Relatório Anual 2013. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>. Acesso em: 23 jun 2013.

ZELENY, R.; ULBERTH, F.; GOWIK, P.; POLZER, J.; GINKEL, L.; EMONS, H.; Developing new reference materials for effective veterinary drug-residue testing in food-producing animals. **Analytical Chemistry,** v. 25, n 9, p.927 – 936, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Vidrarias e materiais de laboratório

a) almofariz e pistilo;
b) balão volumétrico de 10 mL classe A calibrado com incerteza máxima de 0,02 mL a 20ºC;
c) balões volumétricos de volumes variados, incluindo 100 mL e 500 mL;
d) bastão de vidro;
e) bécheres de volumes variados;
f) cápsulas de porcelana;
g) coluna analítica ACE 3 C18, 50 mm de comprimento x 2,1 mm de diâmetro interno, 3 µm de tamanho de partícula (Advanced Chromatography Technologies, Escócia);
h) coluna de guarda ACE 3 C18 para colunas de diâmetro interno 2,1 mm (Advanced Chromatography Technologies, Escócia);
i) cubeta de vidro;
j) dessecador de vidro com sílica gel;
k) dispensadores de solventes 1-10 mL e 1-50 mL (Eppendorf, EUA);
l) espátulas de aço inox;
m) filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno de 0,22 µm;
n) frascos de vidro âmbar de 10 mL com rosca;
o) lacrador e deslacrador de frascos;
p) lacre metálico para vedar rosca;
q) micropipetas de volume variável calibradas de 2-20 mL, 10-100 mL, 50-250 mL, 100-1000 mL, 500-5000 mL com ponteiras descartáveis de polipropileno (Eppendorf, EUA);
r) microtubos tipo Eppendorf 1,5 mL incolores ou coloridos – (Eppendorf, EUA);
s) pinça metálica;
t) pipetas Pasteur;
u) provetas de volumes variados, incluindo 50 mL, 100 mL, 250 mL e 1000 mL;
v) termômetro digital calibrado com faixa de medição de -50ºC a 70ºC (VWR, EUA);
w) tubos de centrífuga tipo Falcon de polipropileno com fundo cônico, capacidade 15 mL e 50 mL, com tampa;
x) "*vials*" âmbar de 1,5 mL para autoamostrador – (Sun Sri, EUA);

APÊNDICE B

Padrões, Reagentes, Soluções e Solventes

a) acetato de sódio (NaOAc) Suprapur® (Merck, ALEMANHA);
b) acetonitrila (ACN) para cromatografia líquida LC/MS (Merck, ALEMANHA);
c) ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) +99% (Merck, ALEMANHA);
d) ácido fórmico (FOA) Suprapur® 98-100% (Merck, ALEMANHA);
e) ácido 2-tiobarbitúrico ≥ 99,0% (Merck, ALEMANHA);
f) ácido tricloroacético P.A. (Merck, ALEMANHA)
g) água purificada tipo I;
h) galato de n-propila 98% (Sigma-Aldrich, EUA);
i) metanol (MeOH) para cromatografia UV/CLAE – (J. T. Baker, EUA);
j) padrão de sal de sódio de nigericina (Sigma-Aldrich, EUA);
k) padrão de salinomicina (Sigma-Aldrich, EUA);
l) padrão de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano 97% (Sigma-Aldrich, EUA);
m) soluções de acetato de sódio nas concentrações de 1 mol/L e 5mmol/L;
n) solução aquosa de ácido tricloroacético a 7,5%, contendo 0,1% de EDTA e 0,1% de n-propilgalato;
o) solução aquosa de ácido tiobarbitúrico a 0,02 mol/L;
p) solução estoques de nigericina na concentração de 1000 μg/mL em MeOH;
q) solução estoques de salinomicina na concentração de 1000 μg/mL em MeOH;
r) solução estoque de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano a 4,85 x 10^{-3} mol/L em ácido tricloroacético a 7,5%;
s) soluções de trabalho de nigericina preparadas a partir da solução estoque nas concentrações de 10 μg/mL e 0,6 μg/mL em MeOH
t) soluções de trabalho de salinomicina preparadas a partir da estoque nas concentrações de 10 μg/mL, 1 μg/mL, 0,3 μg/mL, 0,24 μg/mL, 0,18 μg/mL, 0,12 μg/mL e 0,06 μg/mL em MeOH;
u) solução de trabalho de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano a 4,85 x 10^{-5} mol/L em ácido tricloroacético a 7,5%;
v) solução de MeOH:NaOAc 5mmol/L (30:70, v/v);
w) soluções de 0,1% de FOA em MeOH, 0,1% de FOA em ACN e 0,1% de FOA em H_2O como fases móvel;
x) solução de 100 ng/mL de salinomicina em MeOH: 0,1% FOA em H_2O (80:20, v/v).

APÊNDICE C

Equipamentos e acessórios

Todos os equipamentos e acessórios listados abaixo pertencem ao INCQS, com exceção do Mini Spray Dryer, que pertence ao LabDAFEE do INJC/UFRJ.

a) agitador de tubos múltiplos Multi Reax (Heidolph, ALEMANHA);
b) agitador de tubos tipo vótex (Marconi, BRASIL);
c) balança analítica com resolução de 0,01 g e capacidade máxima de 2100g, modelo PG 2002-S (Mettler Toledo, SUÍÇA);
d) balança analítica com resolução de 0,001 g e capacidade máxima de 620g, modelo LP 620P (Sartorius, ALEMANHA);
e) balança semi-micro com resolução de 0,00001 g e capacidade máxima de 220g, modelo XP205 (Mettler Toledo, SUÍÇA);
f) bobina de Tesla 2-12-8 (Tesla Coil, BRASIL);
g) bomba de seringa (Havard Apparatus, CANADÁ);
h) capela de exaustão;
i) centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);
j) dispersor Ultra-Turrax® T25 basic (IKA® - WERKE, ALEMANHA);
k) espectrofotômetro de Absorção no Ultravioleta/ Visível, modelo UV – 1601PC (Shimadzu, JAPÃO);
l) espectrômetro de Infravermelho, modelo FTIR – 8400 (Shimadzu, JAPÃO);
m) espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 400 MHz (Bruker, ALEMANHA);
n) estufa (Fanem, BRASIL);
o) evaporador rotativo, modelo LABOROTA 4003 – digital (Heidolph, ALEMANHA);
p) freezer de temperatura ultra-baixa CL374-80V (ColdLab, BRASIL);
q) liofilizador K105 (Liotop, BRASIL);
r) mesa agitadora reciprocante (Marconi, BRASIL);
s) mini Spray Dryer Büchi B-290 (Büchi, SUÍÇA);
t) misturador de alta dispersão Polytron PT 6100 (Kinematica, ALEMANHA);
u) módulo de aquecimento/agitação com unidade de evaporação com N_2 React-Therm III (Pierce, EUA);
v) módulo de evaporação Reacti-Vap III (Pierce, EUA);
w) refrigerador – compartimento de refrigeração e de congelamento;
x) sistema LC-MS/MS composto de Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência Shimadzu *Prominence* (Japão) e espectrômetro de massas sequencial API5000 ABSCIEX (EUA), com

interface *TurboIonspray*®. O software *Analyst*® 1.4.2 foi empregado para controle do sistema, aquisição e análise dos dados. A configuração do cromatógrafo a líquido compreende uma bomba quaternária LC-20AD, um degaseificador de membrana DGU-20A5, um autoamostrador SIL- 20AC, um forno de coluna CTO-20AC e uma controladora CBM-20A;

y) sistema de obtenção de água purificada tipo I, Milli-Q (Millipore, EUA);

z) softwares *Excel*® e *Statistica*® 8.0;

A1) termômetro de imersão parcial que compreenda a faixa de 40-55ºC, com divisão máxima de escala de 2°C, para módulo de aquecimento (Pierce, EUA);

B1) vedador de frascos.

APÊNDICE D

Valores das massas das pesagens dos frascos, das amostras e percentual de água perdida.

Identificação	Massa do frasco (g)	Massa do ovo (g)	Massa do frasco + ovo liofilizado (g)	Massa do ovo iofilizado (g)	Massa de água perdida (g)	% de água perdida	% médio de água perdida
A 2 g	12,4828	2,0064	12,9568	0,4740	1,5324	76,38	76,20
B 2 g	12,4821	2,0617	12,9716	0,4895	1,5722	76,26	
C 2 g	12,573	2,0215	13,0656	0,4926	1,5289	75,63	
D 2 g	12,6549	2,02	13,1286	0,4737	1,5463	76,55	
E 2,5 g	12,5157	2,5719	13,13	0,6143	1,9576	76,11	76,34
F 2,5 g	12,3988	2,5503	13,0002	0,6014	1,9489	76,42	
G 2,5 g	12,5248	2,4941	13,1122	0,5874	1,9067	76,45	
H 2,5 g	12,5745	2,5493	13,1764	0,6019	1,9474	76,39	
I 3 g	12,5756	3,0002	13,311	0,7354	2,2648	75,49	76,20
J 3 g	12,5201	3,0817	13,2473	0,7272	2,3545	76,40	
K 3 g	12,4906	3,0518	13,2092	0,7186	2,3332	76,45	
L 3 g	12,508	3,0276	13,2213	0,7133	2,3143	76,44	
M 4 g	12,4499	4,098	13,4517	1,0018	3,0962	75,55	76,05
N 4 g	12,4931	4,0116	13,4479	0,9548	3,0568	76,20	
O 4 g	12,4012	4,0078	13,3556	0,9544	3,0534	76,19	
P 4 g	12,5887	4,0501	13,5498	0,9611	3,089	76,27	
Q 5 g	12,6051	5,037	13,9889	1,3838	3,6532	72,53	75,26
R 5 g	12,4829	5,0061	13,6778	1,1949	3,8112	76,13	
S 5 g	12,4327	5,0024	13,6224	1,1897	3,8127	76,22	
T 5 g	12,3878	5,0042	13,5798	1,192	3,8122	76,18	
U 6 g	12,497	6,0062	14,553	2,056	3,9502	65,77*	75,65
V 6 g	12,5622	6,0005	14,0487	1,4865	4,514	75,23	
W 6 g	12,5554	6,0134	14,0128	1,4574	4,556	75,76	
X 6 g	12,5165	6,0216	13,9644	1,4479	4,5737	75,95	

*Valor excluído da média.

APÊNDICE E

Resultados das medições das concentrações de salinomicina para os estudos de homogeneidade dos lotes produzidos

Estudo de Homogeneidade do lote 1 produzido por liofilização

MR	Concentrações corrigidas (µg/kg) 1 inj	2 inj	3 inj	Média	CV (%)	GRUBBS		
Amostra 3 Lote 1	4,82	4,54	3,96	4,44	8,92	0,858	0,228	-1,094
Amostra 24 Lote 1	5,02	5,08	4,51	4,87	7,29	0,479	0,670	-1,149
Amostra 35 Lote 1	4,78	4,77	4,17	4,57	7,26	0,592	0,563	-1,155
Amostra 42 Lote 1	4,98	4,65	4,18	4,60	8,06	0,977	0,116	-1,053
Amostra 45 Lote 1	5,15	4,83	4,34	4,77	9,30	0,923	0,139	-1,062
Amostra 47 Lote 1	4,85	4,28	4,01	4,38	7,83	1,096	-0,233	-0,863
Amostra 62 Lote 1	4,92	4,44	4,21	4,52	10,19	1,095	-0,230	-0,865
Amostra 66 Lote 1	5,04	4,81	3,81	4,55	11,42	0,744	0,392	-1,137
Amostra 73 Lote 1	5,11	5,02	4,23	4,79	9,12	0,668	0,482	-1,150
Amostra 75 Lote 1	4,99	5,19	4,31	4,83	7,83	0,347	0,780	-1,127
Amostra 92 Lote 1	5,10	4,72	4,43	4,75	8,82	1,042	-0,089	-0,952
Amostra 93 Lote 1	5,15	4,17	4,33	4,55	8,19	1,141	-0,723	-0,418
Amostra 94 Lote 1	4,59	5,02	4,63	4,75	7,50	-0,659	1,151	-0,491
Amostra 102 Lote 1	5,05	5,25	4,33	4,88	10,76	0,358	0,772	-1,130
Amostra 106 Lote 1	4,69	4,61	3,86	4,39	7,86	0,663	0,488	-1,150
Amostra 128 Lote 1	4,95	4,55	4,43	4,64	5,86	1,126	-0,343	-0,784
média global				**4,64**	**3,58**			

Estudo de Homogeneidade do lote 2 produzido por liofilização

MR	Concentrações corrigidas (µg/kg) 1 inj	2 inj	3 inj	média	CV (%)	GRUBBS		
Amostra 8 Lote 2	4,79	4,38	4,70	4,62	4,66	0,773	-1,129	0,356
Amostra 21 Lote 2	4,62	4,46	4,45	4,51	2,12	1,153	-0,524	-0,629
Amostra 26 Lote 2	5,09	4,73	4,38	4,73	7,50	1,005	-0,009	-0,995
Amostra 30 Lote 2	4,58	4,39	4,65	4,54	2,96	0,297	-1,115	0,818
Amostra 32 Lote 2	4,43	4,24	4,25	4,31	2,48	1,153	-0,623	-0,530
Amostra 58 Lote 2	5,15	4,30	4,59	4,68	9,23	1,088	-0,879	-0,208
Amostra 71 Lote 2	4,81	4,46	4,13	4,47	7,61	1,010	-0,020	-0,990
Amostra 74 Lote 2	4,67	4,67	4,27	4,54	5,09	0,577	0,577	-1,155
Amostra 88 Lote 2	5,01	4,83	4,54	4,79	4,95	0,914	0,155	-1,068
Amostra 91 Lote 2	4,55	4,63	4,32	4,50	3,58	0,311	0,808	-1,118
Amostra 92 Lote 2	4,46	4,08	4,57	4,37	5,88	0,350	-1,128	0,778
Amostra 101 Lote 2	4,58	4,64	4,47	4,56	1,89	0,193	0,889	-1,083
Amostra 107 Lote 2	4,68	4,71	4,32	4,57	4,75	0,507	0,645	-1,152
Amostra 112 Lote 2	4,39	4,83	4,42	4,55	5,41	-0,637	1,153	-0,515
Amostra 114 Lote 2	4,61	4,28	4,40	4,43	3,77	1,078	-0,898	-0,180
Amostra 118 Lote 2	4,96	4,69	4,60	4,75	3,94	1,121	-0,320	-0,801
média global				**4,54**	**2,96**			

Estudo de Homogeneidade do lote 3 produzido por *spray drying* a 150 ºC

MR	Concentrações corrigidas (µg/kg) 1 inj	2 inj	3 inj	média	CV (%)	GRUBBS		
Amostra 3 Lote 3	4,62	4,71	4,94	4,76	3,47	-0,828	-0,283	1,111
Amostra 4 Lote 3	4,22	4,73	4,64	4,53	6,01	-1,139	0,735	0,404
Amostra 5 Lote 3	4,83	4,84	4,59	4,75	2,98	0,542	0,612	-1,154
Amostra 7 Lote 3	4,33	5	4,86	4,73	7,47	-1,132	0,764	0,368
Amostra 8 Lote 3	4,45	4,78	4,63	4,62	3,58	-1,029	0,968	0,061
Amostra 9 Lote 3	4,32	5,24	4,91	4,82	9,66	-1,080	0,894	0,186
Amostra 11 Lote 3	4,25	4,91	4,21	4,46	8,82	-0,526	1,153	-0,627
Amostra 20 Lote 3	4,04	4,63	4,68	4,45	8,00	-1,152	0,506	0,646
Amostra 22 Lote 3	4,09	5	4,86	4,65	10,54	-1,143	0,714	0,429
Amostra 27 Lote 3	4,89	4,59	4,83	4,77	3,33	0,756	-1,134	0,378
média global				**4,65**	**2,91**			

Estudo de Homogeneidade do lote 4 produzido por *spray drying* a 120 ºC

MR	Concentrações corrigidas (µg/kg) 1 inj	2 inj	3 inj	média	CV (%)	GRUBBS		
Amostra 2 Lote 4	4,17	5,22	5,02	4,80	11,61	-1,136	0,747	0,389
Amostra 4 Lote 4	4,89	4,84	4,48	4,74	4,72	0,685	0,462	-1,147
Amostra 8 Lote 4	4,52	4,99	4,59	4,70	5,40	-0,710	1,144	-0,434
Amostra 9 Lote 4	4,49	5,06	4,86	4,80	6,02	-1,083	0,888	0,196
Amostra 11 Lote 4	4,35	5,04	4,68	4,69	7,36	-0,985	1,014	-0,029
Amostra 14 Lote 4	4,85	5,11	4,91	4,96	2,75	-0,784	1,126	-0,343
Amostra 21 Lote 4	4,49	5,34	5,05	4,96	8,71	-1,088	0,879	0,208
Amostra 26 Lote 4	4,29	4,36	4,68	4,44	4,68	-0,737	-0,401	1,138
Amostra 32 Lote 4	4,39	5,6	5,05	5,01	12,08	-1,029	0,968	0,061
Amostra 33 Lote 4	4,77	5,15	4,83	4,92	4,15	-0,718	1,142	-0,424
média global				**4,80**	**3,56**			

Estudo de Homogeneidade do lote 5 produzido por *spray drying* a 180 ºC

MR	Concentrações corrigidas (µg/kg) 1 inj	2 inj	3 inj	média	CV (%)	GRUBBS		
Amostra 4 Lote 5	4,45	4,82	4,73	4,67	4,13	-1,123	0,795	0,328
Amostra 6 Lote 5	4,19	4,67	4,54	4,47	5,56	-1,114	0,819	0,295
Amostra 14 Lote 5	4,75	5,22	5,22	5,06	5,36	-1,155	0,577	0,577
Amostra 16 Lote 5	4,38	4,81	4,15	4,45	7,53	-0,199	1,085	-0,886
Amostra 20 Lote 5	4,31	5	5,14	4,82	9,22	-1,140	0,413	0,728
Amostra 22 Lote 5	4,23	4,82	4,71	4,59	6,84	-1,137	0,744	0,393
Amostra 30 Lote 5	4,03	5,12	4,66	4,60	11,89	-1,048	0,944	0,104
Amostra 31 Lote 5	4,61	4,84	4,59	4,68	2,97	-0,504	1,152	-0,648
Amostra 33 Lote 5	4,79	4,56	4,62	4,66	2,56	1,118	-0,810	-0,307
Amostra 34 Lote 5	4,32	5,29	4,92	4,84	10,11	-1,069	0,912	0,157
média global				**4,68**	**3,95**			

APÊNDICE F

Teste t para Duas Amostras Presumindo Variâncias Equivalentes para Avaliação da Equivalência entre os Lotes

	Lote 1	*Lote 2*
Média	4,614536	4,5575
Variância	0,024522	0,018141
Observações	16	16
Variância agrupada	0,021332	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	30	
Stat t	1,104542	
P(T<=t) uni-caudal	0,139069	
t crítico uni-caudal	1,697261	
P(T<=t) bi-caudal	0,278139	
t crítico bi-caudal	2,042272	

APÊNDICE G

Resultados das análises para o teste de avaliação de alterações significativas na concentração de salinomicina das amostras de MR-SAL produzidas por diferentes processos

Amostra de ovo pasteurizado fortificado					
Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3	
Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs
6,61	**1,102**	5,26	**0,873**	5,21	**1,085**
5,43	**-0,253**	5,24	**0,218**	4,89	**-0,201**
4,91	**-0,850**	5,2	**-1,091**	4,72	**-0,884**
Média	**5,7**	**Média**	**5,2**	**Média**	**4,9**
CV (%)	**15,42**	**CV (%)**	**0,58**	**CV (%)**	**5,04**
Média global	**5,3**				
CV (%)	**10,4**				

Amostra de ovo fortificado liofilizado lote 1					
Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3	
Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs
5,08	**0,437**	5,6	**0,826**	5,39	**1,153**
5,15	**0,707**	5,36	**0,285**	4,46	**-0,624**
4,67	**-1,144**	4,74	**-1,112**	4,51	**-0,529**
Média	**5,0**	**Média**	**5,2**	**Média**	**4,8**
CV (%)	**5,22**	**CV (%)**	**8,48**	**CV (%)**	**10,93**
Média global	**5,0**				
CV (%)	**8,3**				

Amostra de ovo fortificado *spray drying* lote 3					
Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3	
Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs
5,1	**0,732**	5,02	**0,984**	5,15	**0,722**
4,87	**-1,139**	4,72	**0,032**	5,08	**0,419**
5,06	**0,407**	4,39	**-1,015**	4,72	**-1,141**
Média	**5,0**	**Média**	**4,7**	**Média**	**5,0**
CV (%)	**2,45**	**CV (%)**	**6,69**	**CV (%)**	**4,63**
Média global	**4,9**				
CV (%)	**5,1**				

Amostra de ovo fortificado *spray drying* lote 4					
Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3	
Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs
5,4	**1,047**	5,37	**1,129**	4,63	**0,810**
4,99	**-0,103**	4,84	**-0,355**	4,57	**0,307**
4,69	**-0,945**	4,69	**-0,774**	4,4	**-1,118**
Média	**5,0**	**Média**	**5,0**	**Média**	**4,5**
CV (%)	**7,09**	**CV (%)**	**7,19**	**CV (%)**	**2,63**
Média global	**4,8**				
CV (%)	**7,2**				

Amostra de ovo fortificado *spray drying* lote 5					
Replicata 1		Replicata 2		Replicata 3	
Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs	Conc calculada (µg/kg)	Valor de Grubbs
4,81	**0,320**	5,46	**1,055**	5,27	**1,136**
4,84	**0,801**	4,75	**-0,122**	4,97	**-0,390**
4,72	**-1,121**	4,26	**-0,934**	4,9	**-0,746**
Média	**4,8**	**Média**	**4,8**	**Média**	**5,0**
CV (%)	**1,30**	**CV (%)**	**12,51**	**CV (%)**	**3,89**
Média global	**4,9**				
CV (%)	**7,0**				

APÊNDICE H

Dados dos testes *F* para o teste de avaliação de alterações significativas na concentração de salinomicina das amostras de MR-SAL produzidas por diferentes processos

Teste-*F*: duas amostras para variâncias

	Fortificada	*Liofilizada*
Média	5,274444444	4,99555556
Variância	0,127292593	0,0505037
Observações	3	3
gl	2	2
F	2,520460546	
P(F<=f) uni-caudal	0,284053744	
F crítico uni-caudal	19	

F<Fcrítico

desvios padrão não significativamente diferentes

Teste-*F*: duas amostras para variâncias

	Fortificada	*Spray dryer 150ºC*
Média	5,274444444	4,901111111
Variância	0,127292593	0,02757037
Observações	3	3
gl	2	2
F	4,617006985	
P(F<=f) uni-caudal	0,178030756	
F crítico uni-caudal	19	

F<Fcrítico

desvios padrão não significativamente diferentes

Teste-*F*: duas amostras para variâncias

	Fortificada	*Spray dryer 120ºC*
Média	5,274444444	4,842222222
Variância	0,127292593	0,072459259
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,756747086	
P(F<=f) uni-caudal	0,36274637	
F crítico uni-caudal	19	

F<Fcrítico.

desvios padrão não significativamente diferentes

Teste-*F*: duas amostras para variâncias

	Fortificada	*Spray dryer 180ºC*
Média	5,274444444	4,886666667
Variância	0,127292593	0,019477778
Observações	3	3
gl	2	2
F	6,535272866	
P(F<=f) uni-caudal	0,132709196	
F crítico uni-caudal	19	

F<Fcrítico.

desvios padrão não significativamente diferentes

APÊNDICE I

Dados dos testes *t* para o teste de avaliação de alterações significativas na concentração de salinomicina das amostras de MR-SAL produzidas por diferentes processos

Teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Fortificada	*Liofilizada*
Média	5,274444444	4,99555556
Variância	0,127292593	0,0505037
Observações	3	3
Variância agrupada	0,088898148	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,145593351	
P(T<=t) uni-caudal	0,157921893	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,315843786	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

t calc < t crit

diferença não significativa entre os resultados

Teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Fortificada	*Spray dryer 150ºC*
Média	5,274444444	4,901111111
Variância	0,127292593	0,02757037
Observações	3	3
Variância agrupada	0,077431481	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	4	
Stat t	1,643174222	
P(T<=t) uni-caudal	0,087845877	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,175691754	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

t calc < t crit

diferença não significativa entre os resultados

Teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Fortificada	*Spray dryer 120ºC*
Média	5,274444444	4,842222222
Variância	0,127292593	0,072459259
Observações	3	3
Variância agrupada	0,099875926	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,675028929	
P(T<=t) uni-caudal	0,084619616	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,169239231	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

t calc < t crit

diferença não significativa entre os resultados

Teste-*t*: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Fortificada	*Spray dryer 180ºC*
Média	5,274444444	4,886666667
Variância	0,127292593	0,019477778
Observações	3	3
Variância agrupada	0,073385185	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	4	
Stat t	1,753171289	
P(T<=t) uni-caudal	0,077221577	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,154443153	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

t calc < t crit

diferença não significativa entre os resultados

APÊNDICE J

Valores das médias das medições de concentrações de salinomicina para os estudos de estabilidade de curta duração

Para 50 ºC do MR-SAL liofilizado (lotes 1)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 101 lote 1 -70ºC	4,31	0
T0 50 lote 1 -70ºC	4,54	0
T1 127 lote 1 50ºC	4,51	3
T1 90 lote 1 50ºC	4,46	3
T2 125 lote 1 50ºC	4,15	7
T2 64 lote 1 50ºC	4,62	7
T3 36 lote 1 50ºC	4,35	14
T3 83 lote 1 50ºC	4,51	14

Para 25 ºC do MR-SAL liofilizado (lotes 2)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 122 lote 2 -70°C	4,53	0
T0 45 lote 2 -70°C	4,34	0
T1 103 lote 2 25°C	4,72	7
T1 75 lote 2 25°C	4,70	7
T2 86 lote 2 25°C	4,41	15
T2 18 lote 2 25°C	4,70	15
T3 117lote 2 25°C	4,11	30
T3 46 lote 2 25°C	4,65	30

Para 25 ºC do MR-SAL *spray drying* a 150ºC (lote 3)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 18 lote 3 -70 ºC	4,65	0
T0 30 lote 3 -70 ºC	4,83	0
T1 29 lote 3 25°C	5,65	7
T1 25 lote 3 25°C	5,27	7
T2 12 lote 3 25°C	5,40	15
T2 21 lote 3 25°C	5,35	15
T3 15 lote 3 25°C	5,31	30
T3 2 lote 3 25°C	5,02	30

Para 25 ºC do MR-SAL *spray drying* a 120ºC (lote 4)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 12 lote 4 -70 ºC	5,36	0
T0 22 lote 4 -70 ºC	4,67	0
T1 7 lote 4 25°C	5,76	7
T1 20 lote 4 25°C	5,21	7
T2 6 lote 4 25°C	5,22	15
T2 10 lote 4 25°C	5,71	15
T3 13 lote 4 25°C	4,94	30
T3 25 lote 4 25°C	5,03	30

Para 25 ºC do MR-SAL *spray drying* a 180ºC (lote 5)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 11 lote 5 -70 ºC	5,11	0
T0 35 lote 5 -70 ºC	5,18	0
T1 15 lote 5 25°C	4,74	7
T1 9 lote 5 25°C	4,53	7
T2 3 lote 5 25°C	4,44	15
T2 26 lote 5 25°C	4,66	15
T3 10 lote 5 25°C	5,08	30
T3 13 lote 5 25°C	5,01	30

Para -20 ºC do MR-SAL liofilizado (lotes 2)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 122 lote 2 -70°C	4,53	0
T0 45 lote 2 -70°C	4,34	0
T1 12 lote 2 -20°C	4,23	7
T1 40 lote 2 -20°C	4,23	7
T2 113 lote 2 -20°C	4,36	15
T2 66 lote 2 -20°C	4,41	15
T3 38 lote 2 -20°C	4,36	30
T3 34 lote 2 -20°C	4,61	30

Para -20 ºC do MR-SAL *spray drying* a 150ºC (lote 3)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 18 lote 3 -70 ºC	4,65	0
T0 30 lote 3 -70 ºC	4,83	0
T1 23 lote 3 -20 ºC	5,48	7
T1 26 lote 3 -20 ºC	5,09	7
T2 24 lote 3 -20 ºC	5,07	15
T2 16 lote 3 -20 ºC	5,41	15
T3 14 lote 3 -20 ºC	4,99	30
T3 31 lote 3 -20 ºC	4,81	30

Para -20 ºC do MR-SAL *spray drying* a 120ºC (lote 4)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 12 lote 4 -70 ºC	5,36	0
T0 22 lote 4 -70 ºC	4,67	0
T1 29 lote 4 -20 ºC	4,77	7
T1 27 lote 4 -20 ºC	5,12	7
T2 30 lote 4 -20 ºC	4,79	15
T2 24 lote 4 -20 ºC	4,69	15
T3 5 lote 4 -20 ºC	4,85	30
T3 28 lote 4 -20 ºC	4,89	30

Para -20 ºC do MR-SAL *spray drying* a 180ºC (lote 5)

Amostras	*Média da concentração de SAL (µg/Kg)*	*Tempo (dias)*
T0 11 lote 5 -70 ºC	5,11	0
T0 35 lote 5 -70 ºC	5,18	0
T1 8 lote 5 -20 ºC	5,28	7
T1 24 lote 5 -20 ºC	4,89	7
T2 17 lote 5 -20 ºC	5,25	15
T2 25 lote 5 -20 ºC	5,06	15
T3 36 lote 5 -20 ºC	5,12	30
T3 23 lote 5 -20 ºC	5,40	30

APÊNDICE K

Análises de regressão dos estudos de estabilidade de curta duração para os lotes produzidos

Para 50 ºC do MR-SAL liofilizados (lotes 1 e 2)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,059145
R-Quadrado	0,003498
R-quadrado ajustado	-0,16259
Erro padrão	0,162152
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,000554	0,000554	0,021062	0,889361
Resíduo	6	0,157759	0,026293		
Total	7	0,158313			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	4,441714	0,087116	50,98623	3,82E-09	4,228549	4,654879	4,228549	4,654879
Variável X 1	-0,00159	0,010932	-0,14513	0,889361	-0,02834	0,025164	-0,02834	0,025164

Para 25 ºC do MR-SAL liofilizados (lotes 1 e 2)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,250454
R-Quadrado	0,062727
R-quadrado ajustado	-0,09349
Erro padrão	0,228182
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,020908	0,020908	0,401551	0,549667
Resíduo	6	0,312403	0,052067		
Total	7	0,333311			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	4,579562	0,123867	36,97151	2,61E-08	4,276469	4,882654	4,276469	4,882654
Variável X 1	-0,00458	0,00723	-0,63368	0,549667	-0,02227	0,01311	-0,02227	0,01311

Para 25 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 150ºC (lote 3)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,306019347
R-Quadrado	0,093647841
R-quadrado ajustado	-0,057410853
Erro padrão	0,338178427
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,07089961	0,07089961	0,619943405	0,46103
Resíduo	6	0,68618789	0,114364648		
Total	7	0,7570875			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	5,075734605	0,183577852	27,64894871	1,48019E-07	4,626536	5,524933	4,626536	5,524933
Variável X 1	0,008437082	0,010715594	0,787364849	0,461029877	-0,01778	0,034657	-0,01778	0,034657

Para 25 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 120ºC (lote 4)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,158843592
R-Quadrado	0,025231287
R-quadrado ajustado	-0,137230166
Erro padrão	0,396658037
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,02443552	0,02443552	0,155306297	0,70714
Resíduo	6	0,944025591	0,157337599		
Total	7	0,968461111			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	5,301890897	0,215323109	24,62295347	2,95145E-07	4,775014	5,828768	4,775014	5,828768
Variável X 1	0,004953146	0,012568591	-0,3940892	0,70714013	-0,03571	0,025801	-0,03571	0,025801

Para 25 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 180ºC (lote 5)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,010753927
R-Quadrado	0,000115647
R-quadrado ajustado	-0,166531745
Erro padrão	0,308725118
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	6,61423E-05	6,61423E-05	0,000694	0,979838
Resíduo	6	0,571867191	0,095311198		
Total	7	0,571933333			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	4,839983266	0,167589324	28,88002143	1,14E-07	4,429907	5,25006	4,429907	5,25006
Variável X 1	0,000257697	0,00978233	0,026343158	0,979838	-0,02368	0,024194	-0,02368	0,024194

Para -20 ºC do MR-SAL liofilizados (lotes 1 e 2)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,35962
R-Quadrado	0,129326
R-quadrado ajustado	-0,01579
Erro padrão	0,132691
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,015692	0,015692	0,891217	0,381593
Resíduo	6	0,105642	0,017607		
Total	7	0,121333			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	4,331734	0,072031	60,13748	1,42E-09	4,155481	4,507986	4,155481	4,507986
Variável X 1	0,003969	0,004204	0,944043	0,381593	-0,00632	0,014257	-0,00632	0,014257

Para -20 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 150ºC (lote 3)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,039864607
R-Quadrado	0,001589187
R-quadrado ajustado	-0,164812615
Erro padrão	0,312347796
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,000931738	0,000931738	0,009550299	0,925333
Resíduo	6	0,585366873	0,097561146		
Total	7	0,586298611			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	5,027843039	0,16955587	29,6530167	9,75298E-08	4,612955	5,442731	4,612955	5,442731
Variável X 1	0,000967202	0,009897119	0,097725629	0,925333015	-0,02325	0,025185	-0,02325	0,025185

Para -20 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 120ºC (lote 4)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,261028945
R-Quadrado	0,06813611
R-quadrado ajustado	-0,087174538
Erro padrão	0,246052028
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,026560118	0,026560118	0,438708557	0,532348
Resíduo	6	0,363249604	0,060541601		
Total	7	0,389809722			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	4,960881861	0,133567665	37,14133857	2,5422E-08	4,634054	5,28771	4,634054	5,28771
Variável X 1	0,005163989	0,007796457	0,662350781	0,532348161	-0,02424	0,013913	-0,02424	0,013913

Para -20 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 180ºC (lote 5)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,354923552
R-Quadrado	0,125970728
R-quadrado ajustado	-0,019700817
Erro padrão	0,155490933
Observações	8

ANOVA

	Gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significação*
Regressão	1	0,020907642	0,020907642	0,864758645	0,388294
Resíduo	6	0,145064581	0,02417743		
Total	7	0,165972222			

	Coeficientes	*Erro padrão*	*Stat t*	*valor-P*	*95% inferiores*	*95% superiores*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interseção	5,099605087	0,084407192	60,41671306	1,38194E-09	4,893068	5,306142	4,893068	5,306142
Variável X 1	0,00458166	0,004926919	0,929923999	0,388293756	-0,00747	0,016637	-0,00747	0,016637

APÊNDICE L

Planilhas com os resultados das avaliações do teste LSD de Fisher para o estudo de estabilidade de curta duração

Para 50 ºC do MR-SAL liofilizados (lotes 1 e 2)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µ g/kg) (Estabilidade_Liofilizado) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,03693, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 4,4254	{2} 4,4869	{3} 4,3847	{4} 4,4317
1	0		0,765011	0,842695	0,975308
2	3	0,765011		0,623118	0,788341
3	7	0,842695	0,623118		0,818784
4	14	0,975308	0,788341	0,818784	

Para 25 ºC do MR-SAL liofilizados (lotes 1 e 2)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µ g/kg) (Estabilidade_Liofilizado) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,05160, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 4,4333	{2} 4,7083	{3} 4,5567	{4} 4,3817
1	0		0,292669	0,615997	0,831222
2	7	0,292669		0,540878	0,223787
3	15	0,615997	0,540878		0,484033
4	30	0,831222	0,223787	0,484033	

Para -20 ºC do MR-SAL liofilizados (lotes 1 e 2)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µ g/kg) (Estabilidade_Liofilizado) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01232, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 4,4333	{2} 4,2300	{3} 4,3867	{4} 4,4833
1	0		0,140942	0,695795	0,675737
2	7	0,140942		0,230983	0,084584
3	15	0,695795	0,230983		0,432992
4	30	0,675737	0,084584	0,432992	

Para 25 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 150 ºC (lote 3)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µg/kg) (Estabilidade_Spray Dryer Lote 3) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,03288, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 4,7383	{2} 5,4633	{3} 5,3733	{4} 5,1667
1	0		0,016153	0,024852	0,077475
2	7	0,016153		0,645689	0,177160
3	15	0,024852	0,645689		0,318006
4	30	0,077475	0,177160	0,318006	

Para -20 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 150 ºC (lote 3)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µg/kg) (Estabilidade_Spray Dryer Lote 3) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,04167, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 4,7383	{2} 5,2833	{3} 5,2400	{4} 4,9000
1	0		0,055812	0,069870	0,472687
2	7	0,055812		0,842263	0,133603
3	15	0,069870	0,842263		0,171118
4	30	0,472687	0,133603	0,171118	

Para 25 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 120 ºC (lote 4)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µg/kg) (Estabilidade_Spray Dryer Lote 4) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,12896, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 5,0167	{2} 5,4833	{3} 5,4667	{4} 4,9833
1	0		0,263597	0,278416	0,930507
2	7	0,263597		0,965207	0,236226
3	15	0,278416	0,965207		0,249544
4	30	0,930507	0,236226	0,249544	

Para -20 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 120 ºC (lote 4)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µg/kg) (Estabilidade_Spray Dryer Lote 4) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,07711, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 5,0167	{2} 4,9433	{3} 4,7433	{4} 4,8717
1	0		0,804764	0,380692	0,629140
2	7	0,804764		0,511228	0,809080
3	15	0,380692	0,511228		0,667997
4	30	0,629140	0,809080	0,667997	

Para 25 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 180 ºC (lote 5)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µ g/kg) (Spreadsheet7) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01261, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 5,1450	{2} 4,6367	{3} 4,5483	{4} 5,0433
1	0		0,010609	0,006036	0,416543
2	7	0,010609		0,475553	0,022340
3	15	0,006036	0,475553		0,011624
4	30	0,416543	0,022340	0,011624	

Para -20 ºC do MR-SAL desidratados por *spray drying* a 180 ºC (lote 5)

Cell No.	LSD test; variable Concentração de Salinomicina (µ g/kg) (Spreadsheet7) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,03374, df = 4,0000				
	Tempos (dias)	{1} 5,1450	{2} 5,0833	{3} 5,1517	{4} 5,2567
1	0		0,753939	0,972785	0,576041
2	7	0,753939		0,728737	0,398757
3	15	0,972785	0,728737		0,598139
4	30	0,576041	0,398757	0,598139	

APÊNDICE M

Metodologias analíticas para determinação de resíduos de anticoccidianos ionóforos poliéteres em ovos

Analitos ionóforos poliéteres	Padrão interno	Tratamento da amostra	Técnica analítica	Recuperação	Detalhes	Instituição/ Laboratório	Referências
MON, LAS, NAR e SAL.	--------	5 g de amostra, extração com 15 mL de MeOH 87%, centrifugação, purificação de 9mL do sobrenadante por SPE, e eluição com 800 µL de MeOH 80%.	LC – MS/MS ESI e MRM.	93% para NAR.	LOD NAR: 0,04 ng/mL SAL: 0,04 ng/mL MON: 0,09 ng/mL LAS: 0,12ng/mL	Administração Nacional de Alimentos - Suécia	(ROSEN, 2001)
MON, LAS, NAR e SAL.	--------	5 g de amostra, + 15 g de Na_2SO_4 anidro, extração com 10 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de 5 mL do extrato por SPE, evaporação até 1 mL a 40°C com N_2.	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para 2,0µg/kg: LAS (101%), MON (103%), SAL(102%), NAR(98%).	LOD: 1 ng/mL para todos os analitos LOQ: NAR: 10 ng/g SAL: 10 ng/g MON: 2,5 ng/g LAS: 50 ng/g	Laboratório de Química do Governo e Universidade de Westminster – Reino Unido	(MATABUDUL et al, 2001)
MON, LAS, NAR e SAL.	NIG	5 g de amostra, adição do PI, extração com 10 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de 5 mL do extrato por SPE, evaporação até 1 mL a 40 °C com N_2.	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para 2,5ng/g: LAS (93%), MON (99%), SAL (99%), NAR (99%), NIC (102%).	LOD: 1 ng/g LOQ: 2,5 ng/g	Grupo de Drogas Veterinárias – Reino Unido	(MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002)
MON, LAS, NAR e SAL.	--------	2,5 mL de amostra, extração com 7,5 mL de ACN, evaporação do extrato até a secura a 50 - 55°C com N_2, adição de mais 7,5 mL de ACN e nova evaporação, ressuspensão com 3 mL de hexano, centrifugação, purificação do extrato por SPE e eluição com 5 – 6 mL de MeOH, evaporação do extrato até a secura a 50 – 55°C com N_2, ressuspensão com 500 µL de MeOH, adição de 500 µL de H_2O, agitação e centrifugação, adição de 100 µL de hexano se houver formação de emulsão turva e grumos.	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para 100 ppb: LAS (60%), MON (85%), SAL (80%), NAR (80%).	LOD: 1 ppb	Administração de Drogas e Alimentos - EUA	(HELLER; NOCHETTO, 2004)
MON, LAS, NAR, SAL e MAD.	DNC-d8*, NIG e DICLAZ-bis*	5 g de amostra, adição do PI, + 10 g de Na_2SO_4 anidro, extração com 15 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de todo o sobrenadante por SPE, evaporação até a secura a 40 °C com N_2 e ressuspensão com 300 µL de ACN.	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para 2 µg/kg: MON (56%), LAS(60%), NAR (53%), SAL (44%) e MAD (52%).	CCα: 0,07 µg/kg para SAL a 0,4 µg/kg para MAD. CCβ: 0,1 µg/kg para SAL a 0,5 µg/kg para MAD.	Laboratório de Hormonologia - Bélgica	(DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004)

Analitos ionóforos poliéteres	Padrão interno	Tratamento da amostra	Técnica analítica	Recuperação	Detalhes	Instituição	Referências
MON, LAS, NAR e SAL.	NIG	10 g de amostra, adição do PI, extração com 10mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação até a secura a 60°C com N_2 e ressuspensão com 500 µL de ACN: H_2O (90:10, v/v).	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para < 1 µg/kg: 50 a 120% Entre 1 e 10 µg/kg: 70 a 110%	CCα: 1 µg/kg para todos os analitos. CCβ: 1,2 µg/kg para LAS a 1,6 µg/kg para NAR.	Ministério da Cominidade Flamenga/ Universidade de Ghent - Bélgica	(MORTIER; DAESELEIRE; PETEGHEM, 2005)
MON, LAS, NAR e SAL.	--------	5 g de amostra, + 15 g de Na_2SO_4 anidro, extração com 20 mL de ACN, agitação e centrifugação, purificação de 5 mL do extrato por SPE, evaporação até a secura a temperatura ambiente com N_2 e ressuspensão com 250 µL de solução de ACN e acetato de amônio 2 mM contendo 2% de acido acético (95:5, v/v).	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para 2,0µg/kg: LAS (87%), MON (99%), SAL (75%), NAR(73%).	CCα: 0,8 µg/kg para NAR a 1,4 µg/kg para LAS. CCβ: 0,9 µg/kg para NAR a 2,0 µg/kg para LAS.	Instituto Nacional de Pesquisa Alimentar e Medicina Veterinária - Finlândia	(ROKKA; PELTONEN, 2006)
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD.	DNC-d8*, NIG e DICLAZ-bis*	2 g de amostra, adição do PI, extração com 8 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação de 5 mL do extrato até a secura a 50 °C com N_2, ressuspensão com 500 µL de solução de acetato de sódio 20 mmol/L : ACN (50:50; v/v).	LC – MS/MS ESI e MRM.	Expressos como tendência para 2 µg/kg: MON (-3%), NAR (-0,1%), SAL (-1,8%), SEN (3,2%) e MAD (-1,9%). Para 150 µg/kg: LAS (-12,2%).	CCα: 0,47 µg/kg para SAL a 0,98 µg/kg para SEN e 164,76 µg/kg para LAS. CCβ: 0,52 µg/kg para MAD a 1,38 para SEN e 180,48 µg/kg para LAS.	Unidade de Resíduos de Drogas Veterinárias - França	(DUBREIL-CHÉNEAU et al, 2009)
MAD, SAL, MON e LAS.	--------	5 g de amostra, + de 10 a 15 g de Na_2SO_4 anidro, extração com 2x 10 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação do sobrenadante até a secura a temperatura ambiente com N_2 e ressuspensão com 1 mL de solução de MeOH.	LC – MS/MS ESI	Para 2,0µg/kg: MAD (79,5%), SAL (85,2%), MON (110,6%) e LAS (83,2%)	LOQ: 0,1 a 0,2 µg/kg	Centro de Controle e Prevenção de Doenças de Beijing - China	(SHAO et al, 2009)
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD.	NIG	2 g de amostra, adição do PI, extração com 2x 4 mL de ACN, agitação e centrifugação, evaporação de 250 µL do extrato até a secura a 46 - 48 °C com N_2, ressuspensão com 1 mL de solução de 5 mmol/L NaOAc:MeOH (70:30; v/v).	LC – MS/MS ESI e MRM.	168,1% para NAR no nível de 1 LMR	CCα: 2,3 µg/kg para MAD, MON, NAR e SEN, 3,4 µg/kg para SAL e 172,6 µg/kg para LAS. CCβ: 2,5 para SEN, 2,7 µg/kg para MAD, MON e NAR, 3,9 µg/kg para SAL e 202,2 µg/kg para LAS. LD: 0,04 µg/kg para SAL, 0,05 µg/kg para MON, 0,06 µg/kg para NAR, 0,09 para SEN, 0,34 µg/kg para MAD e 1,0 µg/kg para LAS. LQ: 0,14 µg/kg para SAL, 0,16 µg/kg para MON, 0,18 µg/kg para NAR, 0,30 para SEN, 1,1 µg/kg para MAD e 3,4 µg/kg para LAS.	Fundação Oswaldo Cruz - Brasil	(SPISSO et al, 2010a)**

Analitos ionóforos poliéteres	Padrão interno	Tratamento da amostra	Técnica analítica	Recuperação	Detalhes	Instituição	Referências
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD.	DNC-d8*, NIG, ROB-d8* e DECOQ-d5*	2 g de amostra, adição do PI, extração com 6 mL de ACN, adição de 4g de Na_2SO_4 anidro, agitação e centrifugação, adição de + 6 mL de ACN, extração da gordura com 5 mL de n-hexano, centrifugação e descarte da fase orgânica superior, repetição do desengorduramento por mais 2 vezes, purificação do extrato por SPE, evaporação de 5 mL do extrato até a secura a 50 °C com N_2, ressuspensão com 1 mL de MeOH.	LC – MS/MS ESI e MRM.	Para 1 µg/kg: MON (113%), NAR (89,1%), SAL (90,2%), SEN (108%), MAD (108%) e LAS (105%).	CCα: 2,2 µg/kg para MON e NAR a 3,3 µg/kg para SAL e 174 µg/kg para LAS. CCβ: 2,4 µg/kg para MON a 3,7 µg/kg para SAL, e 201 µg/kg para LAS.	Instituto Zooprofilatico de Umbria e Quarentena/ Instituo Zooprofilatico da Lombardia e Emilia Romana - Itália	(GALARINI et al, 2011)
MON, LAS, NAR, SAL, SEN e MAD.	DNC-d8*, ROB-d8* e DECOQ-d5*	5 g de amostra, adição do PI, extração com 20 mL de ACN, evaporação de 10 mL do extrato até a secura a 60 °C com N_2 e ressuspensão com 500 µL de ACN:H_2O (80:20, v/v).	UHPLC – MS/MS ESI e MRM.	MON (81%), LAS (55%), NAR (69%), SAL (59%), SEN (81%) e MAD (82%).	CCα: 2,213 µg/kg para SEN a 3,82 µg/kg para SAL e 179 µg/kg para LAS. CCβ: 2,44 µg/kg para SEN a 4,67 µg/kg para SAL e 209 µg/kg para LAS. LQ: 1 µg/kg	Centro de Pesquisa de Alimentos Teagasc/ Universidade da Cidade de Dublin - Irlanda	(MOLONEY et al, 2012)

Obs.: acetonitrila (ACN), decoquinato-d5 (DECOQ-d5), diclazuril (DICLAZ), dinitrocarbanilida-d8 (DNC-d8), lasalocida (LAS), maduramicina (MAD), metanol (MeOH), monensina (MON), acetato de sódio (NaOAc), narasina (NAR), nigericina (NIG), robenidina-d8 (ROB-d8), salinomicina (SAL), senduramicina (SEN), extração por fase sólida (SPE). *Padrões que não são ionóforos poliéteres utilizados porque o método é multi-resíduos. **Método desenvolvido por Spisso, utilizado para a determinação de SAL no presente trabalho.